

**Univerzita Karlova v Praze**

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Izolace a charakterizace fotosyntetických  
komplexů z fotoheterotrofních bakterií**

Isolation and characterization of photosynthetic  
complexes from photoheterotrophic bacteria

Bc. Martin Řádek

Školitel: RNDr. Tomáš Kučera, Ph.D.

Praha, 2010

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně pod vedením školitele RNDr. Tomáše Kučery, Ph.D. a všechny použité prameny jsem řádně citoval.

V Praze dne

## Abstract

Aerobic anoxygenic phototrophs (AAPs) represent a relatively recently discovered unique BChl *a*-containing bacterial community. These organisms own a fully functional bacterial photosynthetic system. Their photosynthesis is operative only in the presence of oxygen. However, they are not able to grow autotrophically, they require a source of organic carbon for growth and metabolism.

I have characterized the photosynthetic apparatus of *Erythrobacter* sp. NAP1, *Roseobacter* sp. COL2P and the strains Dor-2m, Dor-vul and Zun-Kholbo. BChl *a* performs the function of the main light-harvesting pigment. Spheroidenone is the major carotenoid of the strains COL2P, Dor-2m, Dor-vul and Zun-Kholbo. The NAP1 strain contains “non-photosynthetic” erythrooxanthin sulfate, which is bound neither to the reaction center nor to the light-harvesting complex. Bacteriorubixanthinal, zeaxanthin and erythrooxanthin are the main photosynthetic carotenoids of NAP1, coupled to the light-harvesting system. This system is composed of inner LH1 complex and reaction center, with no peripheral LH2 complexes. The photosynthetic unit size, in comparison with a typical anaerobic phototroph *Rhodobacter sphaeroides*, is limited due to the absence of LH2 antenna.

The purified LH1-RC complex isolated from NAP1 is relatively thermostable, photochemically active is up to 35 °C. (In Czech)

## Keywords

Aerobic anoxygenic phototrophs, Aerobic photosynthetic bacteria, Bacteriochlorophyll *a*, Photoheterotrophy, Photosynthetic complexes, Photosynthetic unit size

## Abstrakt

Aerobní anoxygenní fototrofové (AAP) reprezentují relativně nedávno objevenou bakteriální komunitu, jež obsahuje BChl *a*. Tyto organizmy vlastní plně funkční bakteriální fotosyntetický systém. Jejich fotosyntéza však funguje pouze v přítomnosti kyslíku. AAP nejsou schopny samostatného autotrofního růstu, pro růst a metabolismus vyžadují zdroj organického uhlíku.

Charakterizoval jsem fotosyntetický aparát bakterií *Erythrobacter* sp. NAP1, *Roseobacter* sp. COL2P a kmenů Dor-2m, Dor-vul a Zun-Kholbo. Funkci hlavního světlosběrného pigmentu vykonává BChl *a*. Sferoidenon je hlavním karotenoidem v kmenech COL2P, Dor-2m, Dor-vul a Zun-Kholbo. Kmen NAP1 obsahuje „nefotosyntetický“ erythroanthinsulfát, který není vázán v reakčním centru ani ve světlosběrném komplexu. Hlavními fotosyntetickými karotenoidy kmene NAP1, vázanými ve světlosběrném systému, jsou bakteriorubixanthinal, zeaxanthin a erythroanthin. Světlosběrný systém zkoumaných bakterií je tvořen vnitřním komplexem LH1 a reakčním centrem, periferní komplex LH2 není přítomen. Velikost fotosyntetické jednotky je ve srovnání s typickou anaerobní fototrofní bakterií *Rhodobacter sphaeroides* nižší, je to dáno právě absencí antény LH2.

Purifikovaný komplex LH1-RC z kmene NAP1 je relativně termostabilní, fotochemicky aktivní je až do 35 °C.

## Klíčová slova

Aerobní anoxygenní fototrofové, Aerobní fotosyntetická bakterie, Bakterioklorofyl *a*, Fotoheterotrofie, Fotosyntetické komplexy, Velikost fotosyntetické jednotky

## Poděkování

Děkuji svému školiteli, RNDr. Tomáši Kučerovi, Ph.D., za zadání tohoto tématu, za jeho odborné vedení, rady a připomínky při zpracování tématu.

Dále bych rád poděkoval všem pracovníkům Mikrobiologického ústavu AV ČR v Třeboni a pracovníkům Centra biologických technologií v Nových Hradech na Ústavu fyzikální biologie Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích.

Zejména bych rád poděkoval Mgr. Michalu Koblížkovi, Ph.D. za možnost vypracovávat toto téma v laboratořích MBÚ AV ČR v Třeboni, za pěstování bakteriálních kultur *Rhodobacter sphaeroides* a *Roseobacter* sp. COL2P a za jeho cenné rady při zpracování tématu. Děkuji Mgr. Ekaterině Boldarevě, Ph.D. za poskytnutí kmenů Dor-2m, Dor-vul a Zun-kholbo. Dále děkuji Mgr. Davidu Kaftanovi, Ph.D. za umožnění využívat laboratoře Centra biologických technologií v Nových Hradech a za pomoc při měření fotochemické aktivity komplexů LH1-RC. Také bych rád poděkoval Mgr. Alexandru Dulebovi za pěstování bakteriální kultury *Erythrobacter* sp. NAP1 a za výbornou spolupráci při izolaci komplexů LH1-RC.

V neposlední řadě bych rád poděkoval Mgr. Ferdinandu Losovi, se kterým jsem na tomto projektu začínal a překonával počáteční těžkosti.

# Obsah

Seznam zkratk a symbolů	9
Předmluva	10
1 Obecná charakteristika AAP	11
1.1 Objev	11
1.2 Výskyt a zastoupení	11
1.3 Taxonomie a fylogeneze	15
1.4 Morfologie	17
1.5 Původ a evoluční význam	19
2 Fototrofní metabolismus AAP	21
2.1 Fotosyntetické pigmenty	21
2.1.1 Karotenoidy	21
2.1.2 Bakteriochlorofyl	22
2.1.3 Bakteriofeofytin	24
2.1.4 Regulace syntézy pigmentů	24
2.2 Fotosyntetické přenašeče	26
2.2.1 Chinony	26
2.2.2 Cytochromy	26
2.3 Fotosyntetické komplexy	28
2.3.1 Světlosběrný anténní systém	28
2.3.2 Reakční centrum	32
2.3.3 Komplex cyt $bc_1$	33
2.4 Anoxygení fotosyntéza v aerobních podmínkách	34
2.4.1 Přenos energie uvnitř fotosyntetické jednotky	35
2.4.2 Systém přenosu elektronů	36
2.4.3 Fotofosforylace	38
3 Heterotrofní metabolismus AAP	39
3.1 Zdroj organického uhlíku	39
3.2 Fixace $CO_2$	40
3.3 Akumulace látek v buňkách	40
3.4 Alternativní metabolické přístupy	41
3.5 Redukce oxidů těžkých kovů aneb potenciál pro bioremediace	42

4	Cíl práce	44
5	Materiál	45
5.1	Biologický materiál	45
5.2	Seznam použitých chemikálií	45
5.3	Seznam použitých přístrojů	46
6	Metody	47
6.1	Kultivace	47
6.2	Izolace membrán	49
6.3	Izolace komplexů LH1-RC	50
6.4	Ionexová chromatografie	51
6.4.1	Princip ionexové chromatografie	51
6.4.2	Provedení ionexové chromatografie	52
6.5	Ultracentrifugace v hustotním gradientu	52
6.5.1	Princip ultracentrifugace v hustotním gradientu	52
6.5.2	Provedení ultracentrifugace v hustotním gradientu	53
6.6	Spektrofotometrie v ultrafialové a viditelné oblasti	53
6.6.1	Princip spektrofotometrie	53
6.6.2	Stanovení absorpčního spektra	54
6.7	Polyakrylamidová gelová elektroforéza v prostředí SDS	54
6.7.1	Princip SDS-PAGE	54
6.7.2	Provedení SDS-PAGE	55
6.8	Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)	56
6.8.1	Princip HPLC	56
6.8.2	Extrakce pigmentů	57
6.8.3	Provedení HPLC	58
6.9	Kinetická fluorimetrie	58
6.9.1	Princip kinetické fluorimetrie	58
6.9.2	Měření fotochemické aktivity	59
7	Výsledky	60
7.1	Purifikace komplexů LH1-RC	60
7.2	Spektrální analýza fotosyntetického aparátu	61
7.3	Proteinové složení	67
7.3.1	Proteinové složení membrán	67

7.3.2	Proteinové složení frakcí LH1-RC	69
7.4	Složení karotenoidů	70
7.4.1	AAP s karotenoidy „rhodobacterového“ typu	70
7.4.2	AAP s karotenoidy erythrobacterového typu	74
7.5	Pigmentová stechiometrie	76
7.6	Velikost fotosyntetické jednotky	77
7.7	Fotochemická aktivita komplexu LH1-RC	79
8	Diskuze	81
9	Závěr	86
	Seznam použité literatury	87



## Seznam zkratek a symbolů

AAP – aerobní anoxygenní fototrof (z anglického *aerobic anoxygenic phototroph*)

AnAP – anaerobní anoxygenní fototrof (z angl. *anaerobic anoxygenic phototroph*)

APS – peroxodisíran amonný

BChl *a* – bakteriochlorofyl *a*

BPhe *a* – bakteriofeofytin *a*

CM – cytoplazmatická membrána

Cyt – cytochrom

*Erb.* – *Erythrobacter*

F<sub>0</sub> – minimální fluorescence

F<sub>M</sub> – maximální fluorescence

F<sub>V</sub> – variabilní fluorescence

Chl *a* – chlorofyl *a*

ICM – intracytoplazmatická membrána

LDAO – N,N-dimethyldodecylamin-N-oxid

LH1, LH2 – světlosběrný komplex 1, 2 (z angl. *light-harvesting complex*)

MK – menachinon

PSU – fotosyntetická jednotka (z angl. *photosynthetic unit*)

Q – ubiquinon

*Rba.* – *Rhodobacter*

RC – reakční centrum

*Rsb.* – *Roseobacter*

RubisCO – ribulosabisfosfátkarboxylasa/oxygenasa

SDS – dodecylsírán sodný

TEMED – N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin

## Předmluva

Aerobní anoxygenní fototrofní bakterie (AAP) představují nedávno objevenou skupinu fotosyntetických bakterií (Harashima *et al.*, 1978). Tyto organizmy vlastní plně funkční bakteriální fotosyntetický systém, jehož hlavním světlosběrným pigmentem je bakteriochlorofyl *a* (BChl *a*). Tento fotosyntetický aparát představuje evoluční pozůstatek fotosyntetického systému purpurových bakterií, které jsou považovány za nejbližší příbuzné AAP. Na rozdíl od nich jsou však AAP striktní aerobové a fotosyntéza tak probíhá pouze v aerobním prostředí (Yurkov a Csotonyi, 2009). AAP jsou označovány jako tzv. fotoheterotrofní bakterie, jsou to tedy heterotrofní bakterie, vyžadující jako zdroj energie organický uhlík, ale v případě potřeby dokáží až 50 % energie pokrýt ze světla, což jim dává výhodu oproti čistě heterotrofním bakteriím. Samostatného autotrofního růstu však schopny nejsou (Koblížek a Prášil, 2002).

Jak je patrné z názvu, AAP vykonávají typickou bakteriální anoxygenní, tedy kyslík nevyvíjející, fotosyntézu, neboť nevyužívají vodu jako redukční činidlo. Od klasických anaerobních anoxygenních fototrofních bakterií (AnAP) se však odlišují těmito pěti hlavními znaky: (1) požadavek přítomnosti kyslíku pro fotosyntézu, (2) inhibice syntézy BChl světlem, (3) absence Calvinova cyklu a neschopnost růstu v přítomnosti pouze anorganického uhlíku, (4) nízký obsah BChl oproti AnAP, (5) vysoký obsah karotenoidů (Yurkov a Csotonyi, 2009).

# 1 Obecná charakteristika AAP

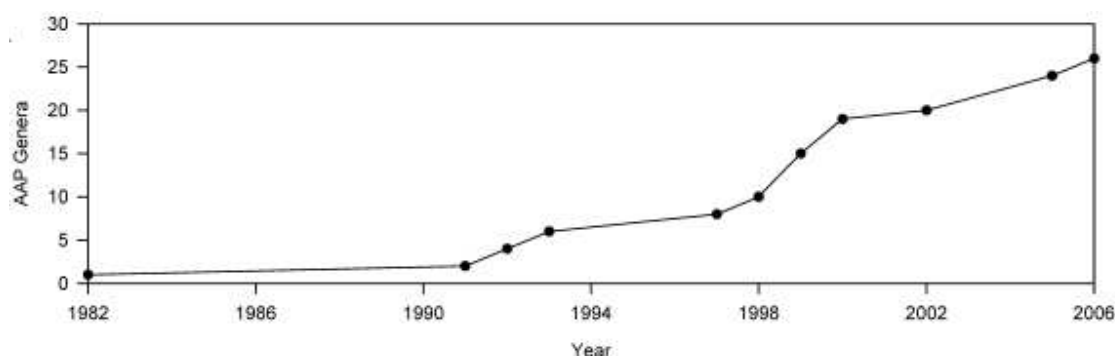
## 1.1 Objev

V roce 1978 byl detekován BChl *a* u tří kmenů bakterií izolovaných z mořských řas, mořské vody a písku v Tokijském zálivu (Harashima *et al.*, 1978). Dva kmeny, oranžový OCh 101 a růžový OCh 114, nepatřily dosud do žádné známé skupiny bakterií, neboť se vyznačovaly aerobními chemoorganotrofními vlastnostmi a nerostly v anaerobních podmínkách ani za světla, ani za tmy (Shiba *et al.*, 1979). Později byl kmen OCh 101 charakterizován a zařazen do zcela nového rodu *Erythrobacter* (z řeckého *erythrus* = červený, z latinského *bacter* = tyčinka) jako druh *Erythrobacter longus* (z lat. *longus* = dlouhý) (Shiba a Simidu, 1982).

## 1.2 Výskyt a zastoupení

Krátce po izolaci prvních AAP převažoval názor, že došlo k objevu malé skupiny unikátních fototrofních bakterií, omezených na konkrétní ekologické niky, převážně eutrofní vody, tzn. bohaté na živiny.

V následujících letech však byly izolovány další rody AAP, které byly nalezeny v nejružnějších především vodních prostředích po celém světě (Shimada, 1995; Yurkov a Beatty, 1998a; Rathgeber *et al.*, 2004; Yurkov, 2006; Yurkov a Csotonyi, 2009). Trend postupných izolací jednotlivých rodů AAP je patrný na obrázku 1-1.



Obr. 1-1

Počet nově popsáných rodů aerobních anoxygenních fototrofních bakterií v letech 1982 až 2006. (převzato z Yurkov a Csotonyi, 2009)

Dnes je známo 52 druhů zařazených ve 33 rodech, přičemž 18 nových druhů AAP bylo popsáno v posledních čtyřech letech (Yurkov a Csotonyi, 2009).

Hledání nových druhů AAP se nejprve zaměřovalo pouze na mořské pobřežní oblasti. Výzkumy na západním a východním pobřeží Austrálie a v zálivu English Bay v Kanadě odhalily zastoupení AAP 10–30 % z celkové heterotrofní bakteriální komunity (Shiba *et al.*, 1991; Yurkov a Beatty, 1998a).

Počátkem 90. let minulého století se další výzkumy rozšířily i do vnitrozemských oblastí. První sladkovodní druhy AAP byly izolovány z jezer v Bajkalské oblasti, z Neskučinského pramene v oblasti Jižních Kuril v Rusku (Yurkov a Beatty, 1998a) a z jezera University Lake v Brisbane v Austrálii (Fuerst *et al.*, 1993). AAP jsou zastoupeny prakticky ve všech typech vnitrozemských vod, vyskytují se ve stojaté i tekoucí vodě, v eutrofní (bohaté na živiny) i oligotrofní (chudé na živiny) vodě, ve sladké i slané vodě (Shimada, 1995; Yurkov a Beatty, 1998a; Rathgeber *et al.*, 2004; Yurkov, 2006; Yurkov a Csotonyi, 2009).

Někteří zástupci dokonce přežívají ve velmi nepříznivých podmínkách pro ostatní mikrobiální populaci. Termotolerantní AAP schopné odolat teplotě až 50 °C byly izolovány z termálních pramenů Usami v Japonsku a Alcafache v Portugalsku (Hanada *et al.*, 1997; Rainey *et al.*, 2003). Acidofilní AAP izolované z kyselých vod odpadního důlního systému a kyselých termálních pramenů v Japonsku dokáží fotosyntetizovat v prostředí o pH = 2 (Wakao *et al.*, 1996). AAP izolované ze slaných jezer na západním pobřeží Austrálie přežívají v prostředí o koncentraci NaCl až 20 % (Suzuki *et al.*, 1999a; Suzuki *et al.*, 1999b).

Hojnost AAP prakticky ve všech ekologických nikách potvrzují nálezy několika druhů v meromiktickém heliotermálním slaném jezeru Ekho Lake, které je lokalizováno ve východní Antarktidě (Labrenz *et al.*, 1999; Labrenz *et al.*, 2000; Labrenz *et al.*, 2005). Dalších více než 30 nových kmenů bylo izolováno z meromiktického slaného jezera Mahoney Lake v Kanadě (Yurkova *et al.*, 2002).

Zajímavé jsou nálezy AAP v tzv. sodných jezerech v jihovýchodní části Sibíře (Sorokin *et al.*, 2000). Sodná jezera se vyznačují aktivním biogeochemickým cyklem síry, při němž dochází k oxidaci nebo redukci sloučenin síry anaerobními fototrofy (Rathgeber *et al.*, 2004); u AAP byla prokázána oxidace thiosíranu (Yurkov a Beatty, 1998a). Právě tato schopnost oxidace thiosíranu zjištěná u bakterie *Roseinatronobacter thiooxidans*, izolované ze sodných jezer na Sibíři, vedla k závěru, že AAP můžou představovat evoluční přechod mezi anaerobním sírným fototrofním a aerobním heterotrofním metabolismem (Sorokin *et al.*, 2000).

Na počátku nového tisíciletí se snaha o nalezení dalších zástupců AAP přesunula opět do mořského prostředí, tentokrát ovšem na otevřená moře a oceány. Tyto výzkumy prokázaly, že AAP obývají téměř celé vodní prostředí na Zemi, tedy včetně otevřených moří a oceánů, převážně však eufotické (tzn. dobře prosvětlené) povrchové vrstvy do hloubky asi 100 m (Kolber *et al.*, 2000). Dále ovšem zůstává nejasné, jaký je podíl AAP v celkové mikrobiální komunitě v povrchových vodách moří a oceánů. V této otázce se jednotlivé výzkumy značně liší (Yurkov a Csotonyi, 2009).

První studie vzorků získaných ze severovýchodního Tichého a severního Atlantského oceánu odhalily zastoupení AAP 1–10 % z celkové mikrobiální populace, hlavně v oligotrofních vodách (Kolber *et al.*, 2001).

Další výzkum se zabýval tzv. sezónním populačním cyklem v severozápadním Atlantiku. Prokázán byl téměř desetinásobný pokles množství AAP od podzimu do jara (Sieracki *et al.*, 2006). Tuto teorii potvrzuje desetkrát menší podíl AAP v Antarktických vodách oproti Karibskému moři (Schwalbach a Fuhrman, 2005). Na druhé straně studie v Baltském moři ukazuje na zastoupení AAP 3–10 % nezávisle na sezónních změnách (Koblížek *et al.*, 2005a).

Zdá se, že teorie o zvyšujícím se množství AAP v oligotrofních vodách je správná, zastoupení AAP 1–10 % v celkové mikrobiální komunitě potvrzují výzkumy v dalších lokacích, např. severozápadním Atlantiku (Koblížek *et al.*, 2003), Středozemním moři (Oz *et al.*, 2005), Černém moři (Koblížek *et al.*, 2006). Studie v jižním Pacifiku, který představuje vysoce oligotrofní prostředí, odhalily celkové množství AAP dokonce 24 % (Lami *et al.*, 2007). Jedinou výjimku tak představuje výzkum v ústí řeky Delaware v USA, což je oblast velmi bohatá na živiny, kde byl naměřen podíl AAP až 34 % (Waidner a Kirchman, 2007).

Asi nejpozoruhodnější objevy byly učiněny při analýze vzorků získaných z okolí podmořského (až 2000 m pod hladinou) hydrotermálního vulkanického vývěru na hřebeni Juan de Fuca v Tichém oceánu. Analýza prokázala přítomnost heterotrofní bakterie obsahující BChl *a*, tedy patřící mezi AAP, jejíž fotosyntéza funguje na bázi geotermálního záření. Tím se znovu otevřela otázka o původu fotosyntézy, neboť podmínky panující ve vulkanických hlubokomořských oblastech jsou srovnatelné s charakterem Země v archaických dobách (Yurkov a Beatty, 1998b). Tento zvláštní pH, halo- a termotolerantní kmen byl pojmenován jako *Citromicrobium bathyomarinum* (Yurkov *et al.*, 1999).

Na konci 90. let minulého století se naleziště dosud pouze ve vodním prostředí rozšířilo i do půdních systémů. První dva půdní zástupci *Craurococcus roseus* a *Paracraurococcus ruber* byly izolovány ve městech Noda, Osaka a Tokio v Japonsku (Saitoh *et al.*, 1998).

Fluorimetrické a mikroskopické analýzy prokázaly výskyt AAP i na území České republiky. V Plešném a Čertově jezeře na Šumavě tvoří AAP více než 50 % bakteriální biomasy, dále byly detekovány v jezeru Cep či lomu Velká Amerika (Mašín *et al.*, 2008).

Přehled jednotlivých zástupců AAP je uveden v tabulce 1-1.

Tab. 1-1

Zařazení, barva a místa nálezů některých aerobních anoxygenních fototrofů.

<u>Rodové a druhové jméno</u>	<u>Zařazení</u>	<u>Barva</u>	<u>Místo nálezů</u> (popsáno)
<b>Sladkovodní:</b>			
<i>Sandaracinobacter sibiricus</i>	$\alpha$ -4	žlutooranžová	Rusko, bakteriální povlak v termálním prameni (Yurkov <i>et al.</i> , 1997)
<i>Erythromonas ursincola</i>	$\alpha$ -4	oranžovohnědá	Rusko, jižní Kurily, povlak sinic v termálním prameni (Yurkov <i>et al.</i> , 1997)
<i>Erythromicrobium ramosum</i>	$\alpha$ -4	červenooranžová	Rusko, povlak řas v termálním prameni (Yurkov <i>et al.</i> , 1994)
<i>Roseococcus thiosulfatophilus</i>	$\alpha$ -1	růžovočervená	Rusko, povlak sinic v termálním prameni (Yurkov <i>et al.</i> , 1994)
<i>Porphyrobacter neustonensis</i>	$\alpha$ -4	oranžovočervená	Austrálie, jezero v subtropické oblasti (Fuerst <i>et al.</i> , 1993)
<i>Acidiphilium rubrum</i>	$\alpha$ -1	růžovočervená	Japonsko, kyselé důlní odpadní vody (Wakao <i>et al.</i> , 1996)
<i>Acidisphaera rubrifaciens</i>	$\alpha$ -1	růžová	Japonsko, kyselé termální prameny a důlní odpadní vody (Hiraishi <i>et al.</i> , 2000)
<i>Sandarakinorhabdus limnophila</i>	$\alpha$ -4	oranžovočervená	Německo, povrchová voda horských jezer (Gich a Overmann, 2006)
<i>Roseateles depolymerans</i>	$\beta$	růžová	Japonsko, říční voda (Suyama <i>et al.</i> , 1999)
<b>Slanovodní:</b>			
<i>Erythrobacter longus</i>	$\alpha$ -4	oranžová	Japonsko, povlak mořských řas v přílivové zóně (Shiba a Simidu, 1982)
<i>Roseobacter denitrificans</i>	$\alpha$ -3	růžová	Japonsko, povlak mořských řas v přílivové zóně (Shiba <i>et al.</i> , 1991)
<i>Citromicrobium bathyomarinum</i>	$\alpha$ -4	žlutá	Tichý oceán, hřeben Juan de Fuca, hlubokomořské termální vývěry (Yurkov <i>et al.</i> , 1999)
<i>Rubrimonas cliftonensis</i>	$\alpha$ -3	růžová	Austrálie, západní pobřeží, slané jezero Clifton Lake (Suzuki <i>et al.</i> , 1999b)
<i>Roseovarius tolerans</i>	$\alpha$ -3	růžovočervená	Antarktida, heliotermální jezero Ekho Lake (Labrenz <i>et al.</i> , 1999)
<i>Roseivivax halotolerans</i>	$\alpha$ -3	růžová	Austrálie, západní pobřeží, slané jezero Clifton Lake (Suzuki <i>et al.</i> , 1999a)

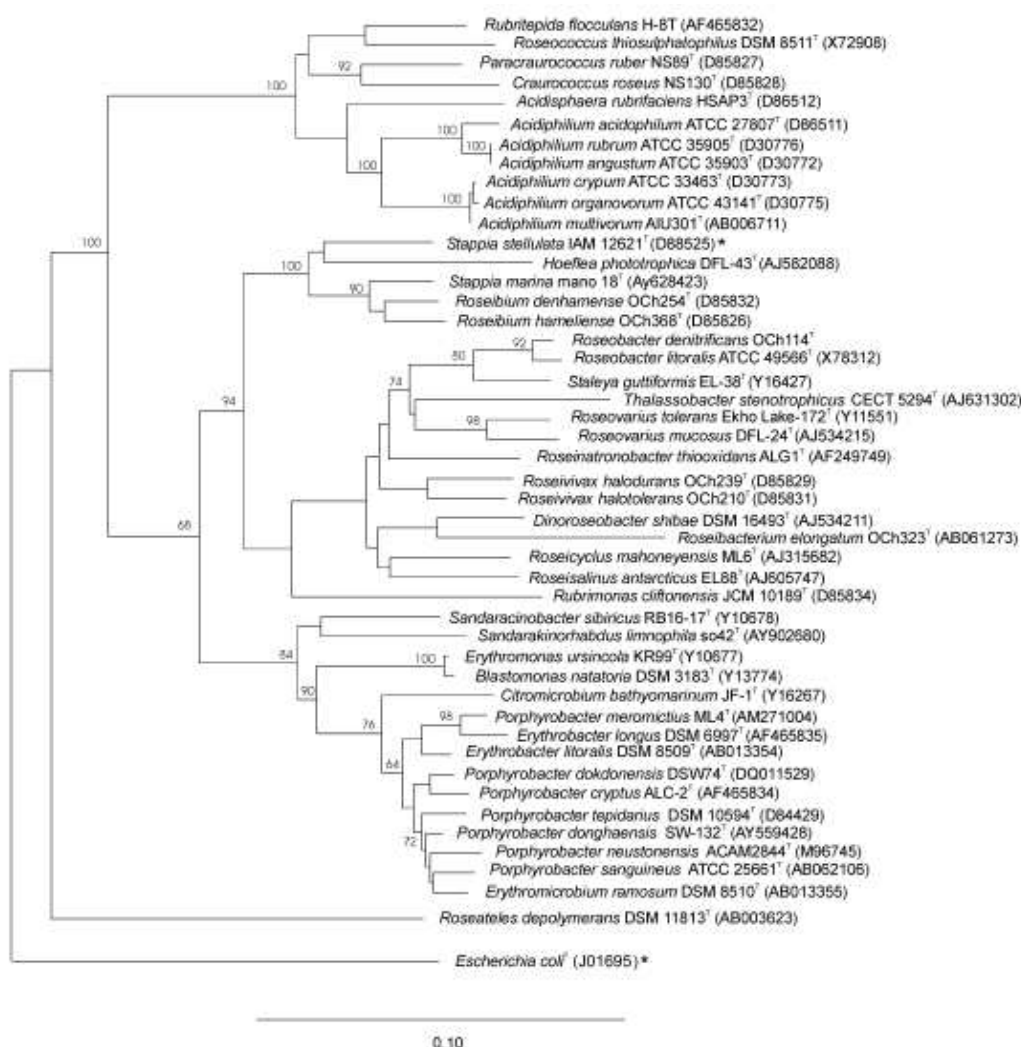
Tab. 1-1  
Pokračování.

<u>Rodové a druhové jméno</u>	<u>Zařazení</u>	<u>Barva</u>	<u>Místo nálezů</u> (popsáno)
<i>Dinoroseobacter shibae</i>	$\alpha$ -3	běžová až světle červená	Severní moře, povlak mořských řas (Biebl <i>et al.</i> , 2005a)
<i>Hoeflea phototrophica</i>	$\alpha$ -2	růžová	Severní moře, povlak mořských řas (Biebl <i>et al.</i> , 2006)
<i>Labrenzia alexandrii</i>	$\alpha$ -2	slabě růžová	Severní moře, povlak mořských řas (Biebl <i>et al.</i> , 2007)
<i>Roseibacterium elongatum</i>	$\alpha$ -3	růžová	Austrálie, západní pobřeží, písek v zálivu Shark Bay (Suzuki <i>et al.</i> , 2006)
<i>Roseicyclus mahoneyensis</i>	$\alpha$ -3	fialová	Kanada, meromiktické slané jezero Mahoney Lake (Rathgeber <i>et al.</i> , 2005)
<i>Roseinatronobacter monicus</i>	$\alpha$ -3	růžová	USA, Kalifornie, slané sodné jezero (Boldareva <i>et al.</i> , 2007)
<i>Roseisalinus antarcticus</i>	$\alpha$ -3	červená	Antarktida, heliotermální jezero Ekho Lake (Labrenz <i>et al.</i> , 2005)
<i>Stappia marina</i>	$\alpha$ -2	červená	Korea, přílivová oblast Dae-Chun a Chung-Nam (Kim <i>et al.</i> , 2006)
<i>Thalassobacter stenotrophicus</i>	$\alpha$ -3	lososově růžová	Středozevní moře, pobřežní vody u Španělska (Macián <i>et al.</i> , 2005)
<i>Staleyia guttiiformis</i>	$\alpha$ -3	běžová až žlutavěhnědá	Antarktida, heliotermální jezero Ekho Lake (Labrenz <i>et al.</i> , 2000)
<i>Congregibacter litoralis</i>	$\gamma$	růžová	Severní moře, povrchové vrstvy vody (Fuchs <i>et al.</i> , 2007)
<b>Půdní:</b> <i>Craurococcus roseus</i>	$\alpha$ -1	růžová	Japonsko, Tokio, městská půda (Saitoh <i>et al.</i> , 1998)
<i>Paracraurococcus ruber</i>	$\alpha$ -1	červená	Japonsko, Noda a Osaka, městská půda (Saitoh <i>et al.</i> , 1998)
<i>Sphingomonas kaistensis</i>	$\alpha$ -4	oranžovočervená	Jižní Korea, Daejeon, povrchová půdní vrstva (Kim <i>et al.</i> , 2007)

### 1.3 Taxonomie a fylogeneze

AAP jsou součástí třídy *Proteobacteria*, v této třídě však netvoří nějakou blíže specifikovanou skupinu, nýbrž se těsně prolínají s ostatními bakteriálními členy. Třída *Proteobacteria* se dále dělí na pět podtříd:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  a  $\epsilon$ . Právě do  $\alpha$  podtřídy zařazujeme naprostou většinu dosud známých a kultivovaných AAP. Známe již však jednoho zástupce  $\beta$  podtřídy a nedávno byl kultivován i jeden zástupce  $\gamma$  podtřídy. Zařazení vybraných AAP do jednotlivých podtříd je uvedeno v tabulce 1-1 (Yurkov a Csotonyi, 2009).

AAP v  $\alpha$  podtřídě spadají do pěti příbuzenských „klastřů“, oddělení  $\alpha$ -1 zahrnuje rody izolované z půdy, termálních pramenů a kyselých odpadních vod. Výhradně mořští zástupci v oddělení  $\alpha$ -2 tvoří dva odlišné „klastry“, první zahrnuje rody *Labrenzia*, *Roseibium* a *Stappia*, do druhého „klastru“ patří *Hoeflea*. Oceánské a halofilní AAP patří do oddělení  $\alpha$ -3, tato skupina AAP, kam patří i rod *Roseobacter*, se úzce prolíná s purpurovými nesírnými bakteriemi, které jsou považovány za nejbližší příbuzné. Poslední oddělení  $\alpha$ -4 zahrnuje širokou skupinu rodů pocházejících z nejrůznějších sladko- i slanovodních prostředí, za zmínku stojí, že rody *Citromicrobium*, *Erythrobacter*, *Erythromicrobium* a *Porphyrobacter* vykazují takovou podobnost, že pouze na základě sekvenční analýzy 16S rDNA jsou prakticky nerozeznatelné (Yurkov a Csotonyi, 2009). Vzájemná příbuznost AAP je patrná z fylogenetického stromu na obrázku 1-2.



Obr. 1-2

Neighbor-joining fylogenetický strom zástupců AAP na základě sekvencí 16S rDNA, hvězdičkou jsou označeny nefototrofní bakterie. Čísla v místech uzlů udávají hodnotu spolehlivosti (bootstrap) vypočítanou technikou opakovaného výběru (resampling technique) – 500 opakování.

Měřítko: 10% míra substituce. (převzato z Yurkov a Csotonyi, 2009)



## 1.4 Morfologie

Všichni členové třídy *Proteobacteria*, tedy i aerobní anoxygenní fototrofové, mají gramnegativní buněčnou stěnu (viz obrázek 1-3B) a jejich buňky vytvářejí nejrůznější tvary (Yurkov a Beatty, 1998a; Rathgeber *et al.*, 2004; Yurkov, 2006; Yurkov a Csotonyi, 2009). Tento jejich typický rys byl také důvodem pro pojmenování celé třídy, neboť název *Proteobacteria* je odvozen od starořeckého boha Protea, který na sebe dokázal brát mnoho různých podob.

Jak již bylo řečeno, AAP charakterizuje rozmanitá morfologie, přesto lze u některých zástupců nalézt společné rysy. Tak například rody *Erythrobacter*, *Acidiphilium*, *Sandaracinobacter*, *Roseibium*, *Roseivivax* a *Roseateles* vytvářejí typické tyčinkovité buňky (Yurkov a Beatty, 1998a; Suyama *et al.*, 1999; Suzuki *et al.*, 1999a; Suzuki *et al.*, 2000; Hiraishi a Shimada, 2001). *Porphyrobacter*, *Roseobacter*, *Erythromonas*, *Rubrimonas* a *Rubritepida* tvoří krátké až vejcovité tyčinky (Yurkov a Beatty, 1998a; Suzuki *et al.*, 1999b; Rathgeber *et al.*, 2004). Buňkami ve tvaru koků se vyznačují rody *Roseococcus*, *Craurococcus*, *Paracraurococcus* a *Acidisphaera* (Yurkov *et al.*, 1994; Saitoh *et al.*, 1998; Hiraishi *et al.*, 2000). Neobvyklé jsou velmi dlouhé tyčinky rodu *Erythromicrobium* (viz obrázek 1-3A) (Yurkov *et al.*, 1994). Zcela pleomorfně se jeví druh *Citromicrobium bathyomarinum*, jehož buňky v závislosti na stáří kultury a složení média mohou utvářet všechny výše zmíněné tvary (Yurkov *et al.*, 1999). Další zajímavostí jsou membránové přívěsky pozorované u pleomorfních bakterií rodu *Porphyrobacter*, tyto přívěsky zvětšují povrch membrány a přispívají tak ke zvýšení přísunu živin (viz obrázek 1-3C) (Yurkov a Csotonyi, 2009).



Obr. 1-3

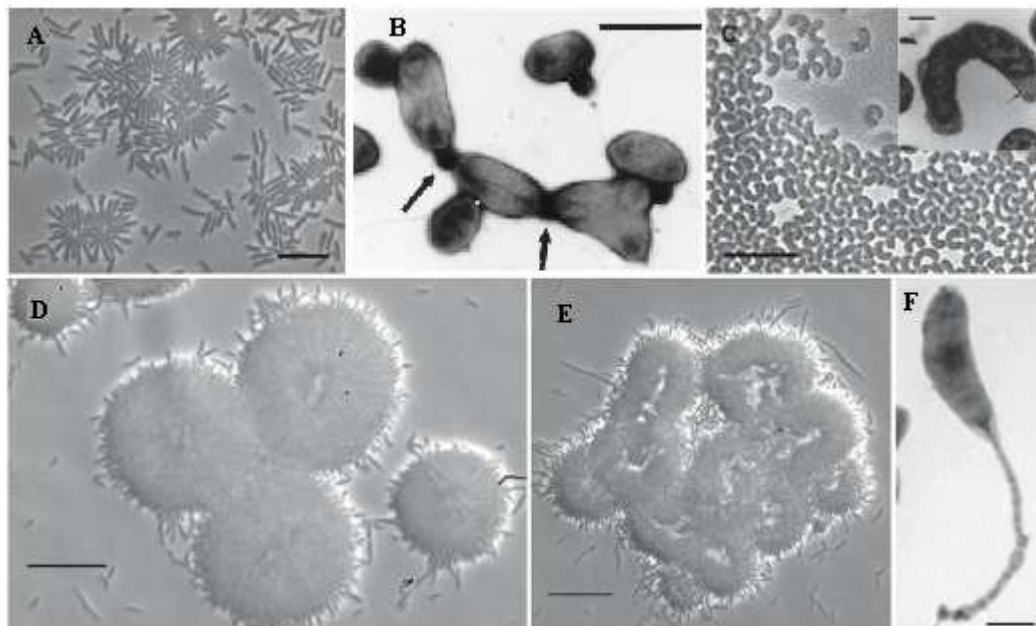
Snímky z elektronového mikroskopu. A) Vytváření větví u bakterie *Erythromicrobium ramosum*. B) Typická gramnegativní buněčná stěna bakterie *Erythrobacter litoralis*. C) Membránový přívěsek bakterie *Porphyrobacter meromictius*.

Měřítko: 1  $\mu\text{m}$  (A); 0,5  $\mu\text{m}$  (C) (upraveno dle Yurkov, 2006; Yurkov a Csotonyi, 2009)

Rozmanitost AAP se projevuje i při vytváření kolonií. Obecně tvorba kolonií dává bakteriím schopnost pohybu, ovšem zdaleka ne všechny AAP se shlukují do kolonií. Existují druhy pohybující se pouze jako samostatné buňky pomocí bičíků nebo druhy vyskytující se hlavně v termálních pramenech, které žijí přisedle na dně, či tvoří povlak sinic a purpurových bakterií (Yurkov a Csotonyi, 2009).

Tvorbu kolonií můžeme pozorovat převážně u AAP obývajících meromiktická slaná jezera, důvodem je schopnost těchto kolonií „plavat“ a zároveň regulovat pohyb v závislosti na salinitě vody, která se mění s hloubkou (Yurkov a Csotonyi, 2009).

Tvary vzniklých kolonií jsou také poměrně různorodé, například rody *Roseovarius*, *Stappia* nebo hlubokomořský kmen C8 vytvářejí hvězdicovité růžice (viz obrázek 1-4A) (Biebl *et al.*, 2005b; Kim *et al.*, 2006). Zatím nezařazené kmeny BL7 a BL14, izolované z meromiktických jezer, se shlukují do růžic podobných květům pampelišky (obr. 1-4D) nebo růžic vypadajících jako „mozkový“ korál (obr. 1-4E), ve kterých jsou jednotlivé buňky spojeny polární hákovitou strukturou (obr. 1-4F) (Rathgeber *et al.*, 2004). Bakterie *Citromicrobium bathyomarinum* spojuje své buňky jakousi bublinovou strukturou neznámé povahy, jež by snad mohla mít určitou funkci při výměně látek mezi buňkami (obr. 1-4B) (Yurkov *et al.*, 1999).

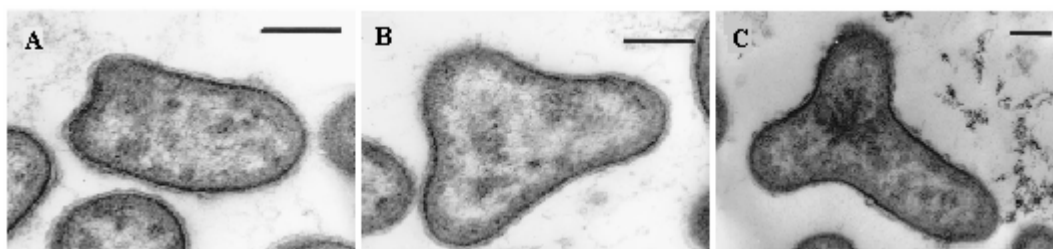


Obr. 1-4

Snímky z elektronového mikroskopu. A) Hvězdicovité růžice kmene C8. B) Spojování buněk bakterie *Citromicrobium bathyomarinum* pomocí neznámé hmoty (označena šipkami). C) Těsně zakroucené buňky bakterie *Roseicyclus mahoneynensis*. D) Růžice kmene BL7. E) Růžice kmene BL14. F) Hákovitá struktura kmene BL14.

Měřítka: 0,25  $\mu\text{m}$  (výřez C); 5  $\mu\text{m}$  (A, C); 1  $\mu\text{m}$  (B); 2,5  $\mu\text{m}$  (D, E); 0,5  $\mu\text{m}$  (F) (upraveno dle Yurkov *et al.*, 1999; Yurkov a Csotonyi, 2009)

Mnoho AAP vykazuje neobvyklé způsoby buněčného dělení. Kromě nejrozšířenějšího binárního dělení, při němž z jedné mateřské buňky vznikají dvě dceřiné, je známo také dělení pučením (*Porphyrobacter neustonensis*) (Fuerst *et al.*, 1993) a zaškrcováním (*Erythromicrobium ezovicum*) (Yurkov a Beatty, 1998a). Pleomorfní *Citromicrobium bathyomarinum* je schopna dělit se nejen všemi výše uvedenými způsoby, ale dokonce i tzv. ternárním dělením, při němž z jedné mateřské buňky vznikají tři dceřiné (viz obrázek 1-5) (Yurkov *et al.*, 1999).



Obr. 1-5

Snímky z elektronového mikroskopu. A–C) Jednotlivé fáze ternárního dělení aerobní anoxygenní fototrofní bakterie *Citromicrobium bathyomarinum*.

Měřítka: 0,25  $\mu\text{m}$  (převzato z Yurkov *et al.*, 1999)

## 1.5 Původ a evoluční význam

Objevem neobvyklých aerobních fototrofů vyvstala logická otázka o jejich původu a evoluci. Dosud známé fototrofní bakterie byly totiž bez výjimky anaerobní, důvodem byla ochrana před tzv. aerobní fototoxicitou, neboť vystavení BChl světlu v přítomnosti kyslíku vede k vytvoření velmi reaktivních forem BChl a kyslíku, které oxidativně poškozují buňky (Beatty, 2002).

Jak je tedy možné, že AAP mohou růst a fotosyntetizovat v přítomnosti kyslíku? Odpověď nalezneme ve třech základních rysech AAP. Za prvé relativně malé množství BChl minimalizuje tvorbu reaktivních forem BChl a kyslíku. Dále BChl je generován pouze za tmy, kdy je to bezpečné. A nakonec vysoký obsah karotenoidů, které chrání reakční centrum před fotooxidací (Beatty, 2002).

Na základě fylogenetických studií je zřejmé, že AAP jsou příbuznou vývojovou větví purpurových fototrofních bakterií (Shimada, 1995). Není však zcela jasný původ fotosyntetického aparátu. První teorie říká, že došlo k určitému laterálnímu přenosu fotosyntetických genů na aerobní heterotrofní bakterie. Druhá se přiklání k tvrzení, že

fotosyntetický aparát je evolučním pozůstatkem anaerobních fototrofů, kteří se přizpůsobili vznikající aerobní atmosféře. Jisté však je, že AAP představují jakýsi tranzitní stav mezi anaerobními fototrofy a aerobními heterotrofy (Yurkov, 2006).

Významným objevem v tomto kontextu byl nález AAP v hlubokomořských oblastech v okolí vulkanických vývěrů. Fotosyntéza těchto organismů funguje na základě geotermálního záření (Yurkov a Beatty, 1998b). Tento objev rozpoutal nové diskuze týkající se původu fotosyntézy, neboť právě podmínky v těchto podmořských vulkanických oblastech simulují podnebí, které panovalo po vzniku Země. Bakteriální anoxygenní fotosyntéza se pravděpodobně vyvinula u organismů obsahujících BChl *a* nebo *b* žijících v blízkosti oceánských hydrotermálních vývěrů, kde se nachází slabá infračervená radiace (Xiong a Bauer, 2002). Další výzkumy těchto hlubokomořských AAP by mohly odhalit potřebné informace o původu fotosyntézy.

## 2 Fototrofní metabolismus AAP

Metabolismus AAP není typickým fotosyntetickým metabolismem jako u AnAP, ale spíše má mixotrofní charakter. Z hlediska struktury fotosyntetického aparátu jsou si sice AAP a AnAP velmi podobné, ovšem při pohledu na fotosyntetický proces pozorujeme zásadní rozdíl. V genomu AAP totiž chybí gen pro klíčový enzym Calvinova cyklu, tj. RubisCO. AAP tak na rozdíl od AnAP nemůžou fixovat CO<sub>2</sub> autotrofně (Yurkov a Beatty, 1998a; Swingley *et al.*, 2007).

### 2.1 Fotosyntetické pigmenty

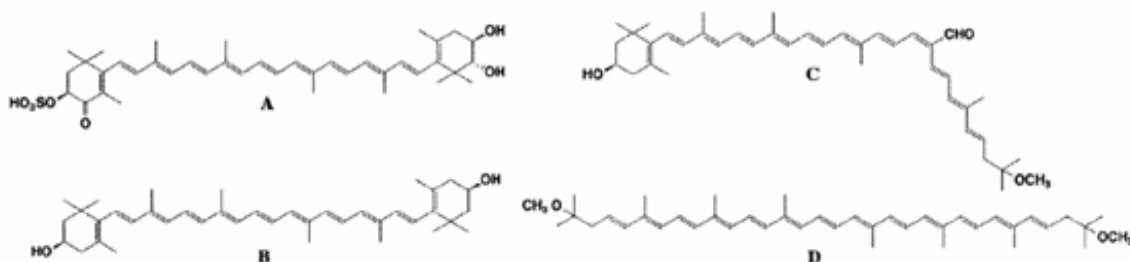
#### 2.1.1 Karotenoidy

Všechny druhy AAP syntetizují velké množství karotenoidů, jež určují barvu těchto organismů a absorbují v modré a zelené oblasti spektra (Yurkov a Beatty, 1998a). Složení karotenoidů většiny AAP a AnAP se značně liší. Obě skupiny bakterií sice obsahují méně polární karotenoidy, ale tzv. „nefotosyntetické“ polární karotenoidy se vyskytují pouze u AAP (Shimada, 1995). Oproti karotenoidům přítomným v AnAP neplní většina karotenoidů v AAP světlosběrnou funkci ani se nijak nezapojuje do přenosu světelné energie (Koblížek *et al.*, 2003). Mají však jinou, neméně důležitou funkci, chrání totiž reakční centrum před fotooxidací. Děje se tak tzv. zhášením toxických molekul tripletního BChl a singletního kyslíku, které vznikají vystavením BChl světlu v aerobním prostředí (Krinsky, 1979; Fraser *et al.*, 2001).

AAP můžeme podle karotenoidového složení klasifikovat do pěti skupin. V první skupině, kam patří *Acidiphilium* a *Roseateles*, je dominantní spirilloxanthin. Druhou skupinu s *Roseobacter* a *Erythromonas* charakterizuje přítomnost sferoidenu a dominantního sferoidenonu. *Craurococcus* a *Paracraurococcus* s malým obsahem spirilloxanthinu a velkým množstvím blíže nedefinovaných karotenoidových kyselin tvoří třetí skupinu. Do čtvrté skupiny zahrnujeme druhy *Methylobacterium rhodinum* a *Roseococcus thiosulfatophilus* s cukernými deriváty karotenu. Pátou skupinu tvoří rody *Erythrobacter*, *Porphyrobacter* a *Erythromicrobium*, tato skupina je charakterizována polárními karo-

tenoidovými sulfáty, karotenem a jeho hydroxy deriváty a také spirilloxanthinem (Takaichi, 1999).

Karotenoidy výše uvedené páté skupiny, neboli karotenoidy tzv. erythrobacterového typu, můžeme z hlediska struktury rozdělit do čtyř skupin: (1) bicyklické ( $\beta$ -karoten a jeho hydroxy deriváty jako například zeaxanthin, kaloxanthin nebo kryptoxanthin), (2) monocyklické (bakteriorubixanthinal), (3) acyklické (spirilloxanthin) a (4) polární karotenoidy (erythroxanthinsulfát) (Yurkov a Beatty, 1998a; Yurkov, 2006). Strukturní vzorce několika karotenoidů jsou uvedeny na obrázku 2-1.



Obr. 2-1

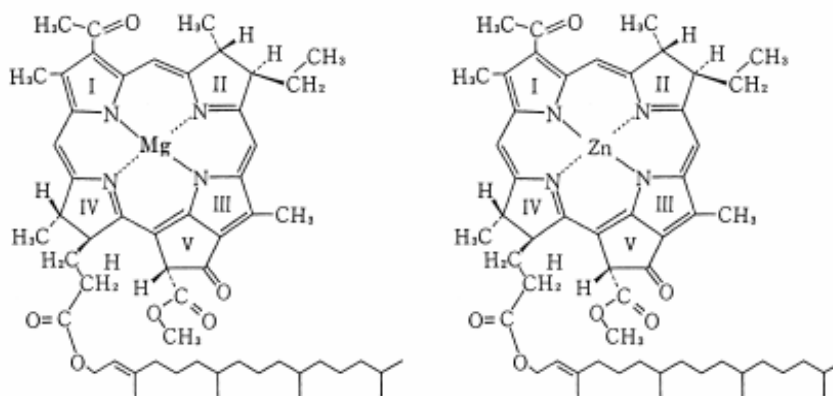
Strukturní vzorce karotenoidů typických pro AAP *Erythrobacter longus*. A) Erythroxanthinsulfát. B) Zeaxanthin. C) Bakteriorubixanthinal. D) Spirilloxanthin. (převzato z Shimada, 1995)

## 2.1.2 Bakteriochlorofyl

Přítomnost BChl je dalším typickým rysem AAP. Tento pozoruhodný bakteriální pigment je schopný absorbovat energii elektromagnetického záření a řetězcem reakcí separace nábojů ji přeměnit na energii chemickou (Yurkov a Csotonyi, 2009). Tyto pro BChl typické světlosběrné přenosy energie a reakce přenosu elektronů jsou umožněny díky dlouhé životnosti jeho excitovaného stavu a vhodnému redoxnímu potenciálu (Yurkov a Beatty, 1998a). Jediným u AAP dosud nalezeným BChl je BChl *a* s esterifikovaným fytolem (viz obrázek 2-2 na následující straně), důvodem je zřejmě jeho dobrá stabilita v aerobním prostředí (Shimada, 1995; Yurkov a Beatty, 1998a).

U několika zástupců rodu *Acidiphilium* byl pozorován BChl *a* s chelatovaným iontem zinku (viz obrázek 2-2 na následující straně) namísto obvyklého iontu hořčíku. Tímto se tyto organizmy stávají unikátem, neboť jde o jediný známý případ přirozené syntézy BChl s jiným než hořčíkovým centrálním atomem. Příčinu této záměny najdeme ve stabilitě BChl v kyselém prostředí. BChl s inkorporovaným atomem zinku je totiž milionkrát odolnější vůči ztrátě kovového ligandu (feofytinizaci) působením kyselin než

BChl s atomem hořčíku. Díky tomu mohou bakterie rodu *Acidiphilium* fotosyntetizovat i v extrémně kyselém prostředí s hodnotami pH až kolem 2 (Yurkov a Beatty, 1998a; Rathgeber *et al.*, 2004; Yurkov, 2006; Yurkov a Csotonyi, 2009).



Obr. 2-2

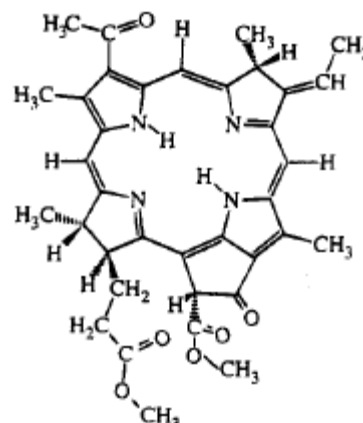
Strukturní vzorce Mg-BChl a a Zn-BChl a. (převzato z Hiraishi a Shimada, 2001)

Buňky AAP obsahují relativně malé množství BChl, ve srovnání s buňkami AnAP je to až desetkrát méně. Nízký obsah BChl v buňce dokumentuje i poměr BChl a karotenoidů od 1 : 8 až k 1 : 10. Důvody můžeme hledat jednak v samotné struktuře buňky AAP, která na rozdíl od buněk AnAP neobsahuje tzv. intracytoplasmatickou membránu, v níž se soustřeďuje naprostá většina pigmentoproteinových komplexů. A právě v těchto komplexech, tedy jak v reakčním centru tak i ve světlosběrných anténách jsou zabudovány molekuly BChl (Yurkov a Beatty, 1998a; Yurkov, 2006; Yurkov a Csotonyi, 2009). Dalším důvodem může být již v kapitole 2.1.1 zmíněná toxicita tripletního BChl, který vzniká za světla v aerobním prostředí. V tomto směru je malý obsah BChl vlastně výhodou, neboť čím méně toxických sloučenin BChl vznikne, tím snadněji ochrání karotenoidy reakční centrum AAP před fotooxidací (Fraser *et al.*, 2001).

Samozřejmě i zde existuje několik výjimek. Například poměr BChl : karotenoidy 1,2 : 1 u AAP *Roseicyclus mahoneyensis* je srovnatelný s hodnotami běžnými pro anaerobní fototrofy. Je to dáno tím, že *Roseicyclus mahoneyensis*, jako jedna z mála AAP, disponuje, podobně jako AnAP, přítomností světlosběrné antény LH2, ve které jsou inkorporovány molekuly BChl (Rathgeber *et al.*, 2005). Otázkou však zůstává, jak se zmíněná bakterie vypořádává s tripletními molekulami BChl, které v tomto případě vznikají jistě ve větší míře (Yurkov a Csotonyi, 2009).

### 2.1.3 Bakteriofeofytin

Bakteriofeofytin (BPhe) plní funkci intermediárního elektronového akceptoru v procesech elektronových přenosů, jež jsou součástí fotosyntézy. V AAP je přítomen pouze BPhe *a*. Z hlediska struktury se jedná prakticky o BChl, u kterého je centrální atom hořčíku nahrazen dvěma protony (viz obrázek 2-3). BPhe je stejně jako BChl součástí reakčního centra, vazba BPhe k polypeptidovému řetězci však není zprostředkována přes histidinový ligand. Interakce s polypeptidovým řetězcem je výhradně nekovalentní (Fritzsche a Kuglstatter, 1999).



Obr. 2-3  
Strukturní vzorec BPhe.  
(převzato z Zhang a Friesner, 1995)

### 2.1.4 Regulace syntézy pigmentů

Fotosyntetické pigmenty hrají klíčovou roli v procesech fototrofního metabolismu, proto jsou podmínky regulace jejich syntézy důležitým předmětem studia. Dvěma základními faktory ovlivňující syntézu pigmentů jsou přítomnost kyslíku a intenzita osvětlení (Shimada, 1995; Yurkov a Beatty, 1998a).

Hlavní rozdíl mezi AAP a AnAP je v požadavku na kyslík, to se projevuje i v ovlivnění syntézy BChl. Ten je u AAP syntetizován pouze v aerobních podmínkách (Harashima *et al.*, 1980; Shimada, 1995). Jedinou výjimku představuje bakterie *Roseobacter denitrificans*, která je schopna využívat alternativní akceptory elektronů (např. dusičnany či trimethylamin-N-oxid), čímž dokáže růst a dokonce i syntetizovat malé množství BChl anaerobně (Yurkov a Beatty, 1998a).

Mechanismy regulace syntézy Bchl můžeme hledat i na enzymatické úrovni. Nedávno byl objeven enzym AcsF (z angl. *aerobic cyclase F*), jenž je homologem známého enzymu BchE (z angl. *anaerobic Mg-protoporphyrin monomethylester cyclase*). Oba enzymy katalyzují tvorbu klíčového meziprojektu v syntéze BChl i Chl, tedy přeměnu methyl magnesium protoporfyrinu IX na methyl magnesium divinyl protochlorofylid (vznik kruhu V). AcsF získává atom kyslíku z molekuly O<sub>2</sub>, zatímco



BchE využívá k tomuto účelu molekulu vody (Ouchane *et al.*, 2004). Předpokládalo se tedy, že AAP budou BChl a syntetizovat aerobně pomocí AcsF. Ovšem sekvenční analýza celého genomu bakterie *Rsb. denitrificans* odhalila přítomnost genů obou zmíněných enzymů (Swingley *et al.*, 2007), což jí umožňuje BChl a syntetizovat aerobně i anaerobně (Ouchane *et al.*, 2004). Množství BChl je také ovlivněno koncentrací kyslíku v prostředí, tento atribut však není ještě zcela objasněn, neboť jednotlivé druhy AAP syntetizují maximální množství BChl při různých koncentracích kyslíku (Yurkov a Csotonyi, 2009).

Regulace syntézy karotenoidů přítomností kyslíku se liší v závislosti na typu karotenoidů (Shimada, 1995). Zatímco karotenoidy vázané na reakční centra AAP jsou na aerobních podmínkách závislé, syntéza „nefotosyntetických“ karotenoidů se změnou obsahu kyslíku prakticky nemění (Harashima *et al.*, 1980).

Ještě složitější se zdá být mechanismus regulace syntézy pigmentů světlem (Yurkov a Csotonyi, 2009). Obecně je u všech fototrofních bakterií syntéza BChl potlačena vysoce intenzivním osvitem, nejinak je tomu i u AAP. Nedochází však pouze k potlačení syntézy BChl *de novo*, ale také k degradaci již existujících molekul BChl (Shimada, 1995). Většina AAP syntetizuje BChl za tmy, děje se tak z důvodu ochrany před samotnými molekulami BChl (Shimada, 1995; Yurkov a Beatty, 1998a; Yurkov a Csotonyi, 2009). BChl se totiž za světla a v aerobním prostředí mění na toxický tripletní BChl, který je nebezpečný pro samotnou buňku (Beatty, 2002). U některých druhů AAP byla maximální syntéza BChl pozorována při přerušovaném ozařování (Yurkov a Beatty, 1998a). Můžeme tedy tvrdit, že fotosyntéza prováděná AAP je na jednu stranu výhodná, neboť funguje jako přídatný zdroj energie k heterotrofnímu metabolismu. Ovšem na druhou stranu se může stát pro buňku i osudnou. Klíčovou roli zde hraje dosud ne zcela probádaný systém ovlivňování syntézy BChl a tudíž i fotosyntetického aparátu světlem (Yurkov a Csotonyi, 2009).

Dalšími faktory, které ovlivňují syntézu pigmentů, může být teplota, pH a slanost prostředí. Společným rysem je fakt, že k maximální syntéze BChl dochází v podmínkách odlišných od těch, které by odpovídaly ideálnímu růstu bakteriálních kultur (Yurkov a Csotonyi, 2009). Například bakterie *Erythrobacter* sp. NAP1 roste nejlépe při teplotě 32,5 °C, ovšem maximální syntéza BChl probíhá v 22,5 °C, při teplotách nad 30 °C se syntéza zastaví úplně (Koblížek *et al.*, 2003). Pravděpodobné se tak zdá, že AAP využívají fotosyntézu nejvíce, pokud se nacházejí v neoptimálních růstových podmínkách, tj. například v oblastech chudých na živiny, když nemají dostatečný zdroj organického uhlíku pro heterotrofní růst (Yurkov a Csotonyi, 2009).

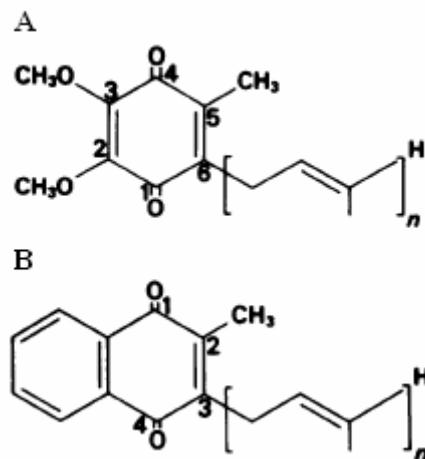
## 2.2 Fotosyntetické přenašeče

### 2.2.1 Chinony

Chinony jsou lokalizovány v membránách buněk rostlin, živočichů i mnoha bakterií, kde plní funkci redoxních přenašečů v procesech aerobní a anaerobní respirace a fotosyntézy (Yurkov a Beatty, 1998a).

Složením chinonů se fototrofní bakterie vzájemně liší. Některé druhy bakterií obsahují pouze ubiquinon s deseti izoprenovými zbytky ( $Q_{10}$ ), jiné druhy mohou využívat ubiquinony  $Q_8$  nebo  $Q_9$ , stejně tak jako menachinony  $MK_8$  nebo  $MK_9$  (viz obrázek 2-4) (Collins a Jones, 1981).

U AAP je jediným dominantním chinonem ubiquinon  $Q_{10}$  (Shimada, 1995). Ovšem jsou známy i případy využití jiného typu ubiquinonu jako přídatného redoxního přenašeče. Například u druhů *Sandaracinobacter sibiricus*, *Erythromicrobium ramosum* a *evozicum* byl detekován minoritní ubiquinon  $Q_9$ . Naproti tomu bakterie *Erythromicrobium hydrolyticum* obsahuje přibližně stejné množství ubiquinonů  $Q_{10}$  i  $Q_9$ . Obecně je celkové zastoupení ubiquinonových molekul u AAP nižší než u AnAP, pochopitelně je to dáno menším počtem fotosyntetických komplexů (Yurkov a Beatty, 1998a).



Obr. 2-4  
Strukturní vzorce chinonů.  
A) Ubichinon. B) Menachinon.  
(převzato z Collins a Jones, 1981)

### 2.2.2 Cytochromy

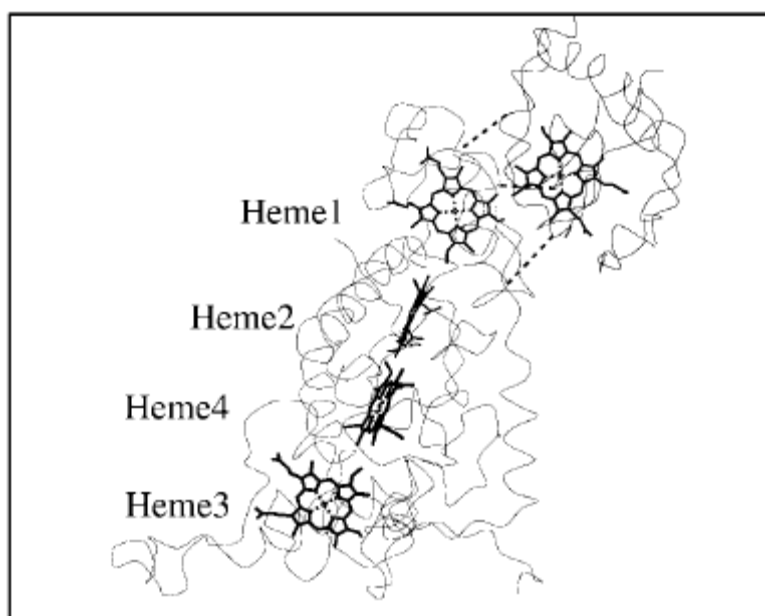
Cytochromy (cyt) nacházíme ve většině organismů, kde jsou součástí aerobního respiračního řetězce, ale nalezneme je i ve fakultativních a striktních anaerobech, fakultativních fotoheterotrofech a sinicích, v nichž se podílí na fotosyntéze (Yurkov a Beatty, 1998a). Jejich fotosyntetická funkce souvisí s reakcemi přenosu elektronů a současně s transportem protonů přes membránu. K tomu je třeba dvou integrálních

membránových komplexů, jednak fotosyntetického reakčního centra (RC), jednak komplexu cyt  $bc_1$  (podrobněji v kapitole 2.3.3) (Gray a Daldal, 1995).

Důležitým procesem zajištěným cytochromy je opětovné navrácení elektronů na fotooxidovaný zvláštní pár BChl v reakčním centru (Yurkov a Csotonyi, 2009). Z tohoto hlediska můžeme AAP rozdělit na dvě skupiny (Yurkov a Beatty, 1998a).

V první skupině, kam zařazujeme rody *Erythrobacter* a *Erythromicrobium*, je reakční centrum přímo redukováno rozpustným cyt  $c_2$ , který se pohybuje v periplazmatickém prostoru. Tento systém je typický i pro anaerobní bakterii *Rhodobacter sphaeroides* (Yurkov a Beatty, 1998a).

Druhou skupinu tvoří rody *Roseobacter*, *Roseococcus*, *Roseicyclus*, *Citromicrobium*, *Sandaracinobacter* a *Erythromonas*. V tomto případě jsou elektrony pře-



Obr. 2-5

Redukce fotooxidované podjednotky C RC cytochromem  $c_2$  purpurové bakterie *Rhodopseudomonas viridis*. Interakce mezi Glu zbytky C podjednotky RC a Lys zbytky cyt  $c_2$  naznačují přerušované čáry. (převzato z Lancaster a Michel, 2001)

dány cyt  $c_2$  na tetrahemový cyt  $c$  (C podjednotka RC) (viz obrázek 2-5), který je těsně vázaný k reakčnímu centru. Následně dochází k okamžité redukci fotooxidovaného reakčního centra. Takto probíhá tato redukce i u většiny AnAP (Yurkov a Beatty, 1998a; Yurkov a Csotonyi, 2009).

Neobvyklé je ukotvení tetrahemového cyt  $c$  k membráně pozorované u bakterie *Roseobacter denitrificans*. Toto ukotvení zpro-

středkovává běžně protein PufC, u bakterie *Roseobacter denitrificans* je však jeho cysteinový zbytek nahrazen isoleucinem, čímž se mění mechanismus ukotvení (Hucke *et al.*, 2003). Celé transmembránové uspořádání je nyní podobné polypeptidu PufX (podrobněji v kapitole 2.3.1), který byl popsán u bakterie *Rhodobacter sphaeroides*, ta ovšem tetrahemový cyt  $c$  nemá. Z výše uvedeného opět vyplývá důležitý evoluční význam AAP jako mezistupně ve vývoji fototrofních bakterií (Yurkov a Csotonyi, 2009).

## 2.3 Fotosyntetické komplexy

BChl *a* syntetizovaný AAP je zabudováván do membránových proteinových komplexů, vzniká tak plně funkční bakteriální fotosyntetický aparát, jenž zahrnuje reakční centrum, světlosběrný systém a komplex cytochromů *bc*<sub>1</sub> (Yurkov a Csotonyi, 2009). Fotosyntetické komplexy klasické bakteriální fotosyntézy prováděné AnAP jsou lokalizovány v intracytoplazmatické membráně (ICM), která představuje určité měchýřkovité invaginace vycházející z cytoplazmatické membrány (CM) (Kiley a Kaplan, 1988). AAP však ICM nemají, proto jsou jejich pigmentoproteinové komplexy umístěny uvnitř CM, což je další příčinou syntézy malého množství BChl *a* a tím pádem menšího počtu fotosyntetických komplexů oproti AnAP (Shimada, 1995; Yurkov a Beatty, 1998a; Yurkov a Csotonyi, 2009).

### 2.3.1 Světlosběrný anténní systém

Pro fotosyntézu klíčová absorpce světelného kvanta je zajišťována dvěma systémy, vlastním reakčním centrem (podrobněji v kapitole 2.3.2) a světlosběrným (LH, z angl.



Obr. 2-6

Model fotosyntetické jednotky purpurové bakterie *Rhodobacter sphaeroides*. RC se nachází uprostřed většího kruhu (anténa LH1), anténa LH2 představuje menší kruh, jednotlivé kofaktory jsou odlišeny barevně. (převzato z Cogdell a Lindsay, 2000)

*light-harvesting*) komplexem (Yurkov a Beatty, 1998a).

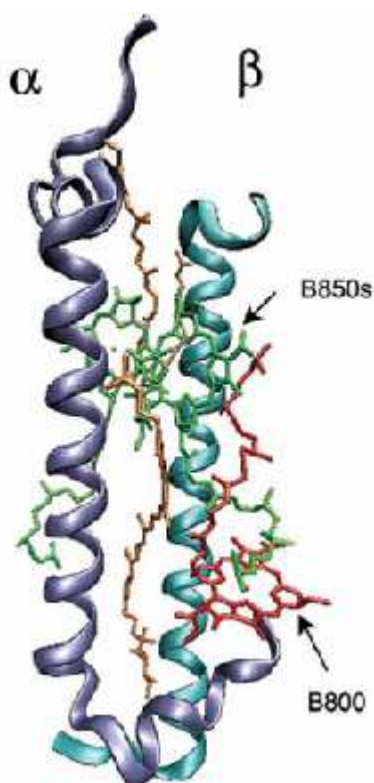
Ten jednak zvětšuje povrch pro zachycení světelného kvanta, a zároveň rozšiřuje spektrální rozsah každého reakčního centra (Cogdell *et al.*, 1999). Světlosběrný systém je tvořen dvěma anténami (viz obrázek 2-6).

Vnitřní anténa LH1 těsně obklopuje reakční centrum a utváří tak s ním LH1-RC

komplex, který je přítomen u všech fototrofních bakterií. Naproti tomu periferní anténu LH2, umístěnou vně komplexu LH1-RC, fototrofní bakterie často postrádají (Cogdell a Lindsay, 2000).

Strukturně jsou oba anténní komplexy, LH1 i LH2, založeny na stejném principu. Skládají se ze dvou malých (velikost asi 50 aminokyselin) apoproteinů  $\alpha$  a  $\beta$ , na které jsou nekovalentně vázány pigmenty (BChl a karotenoidy). Analýza aminokyselinové sekvence těchto apoproteinů prokázala jejich polární charakter v blízkosti N- a C-konce a nepolární charakter ve středu molekuly. Apoproteinové  $\alpha$ -helixy procházejí napříč membránou, přičemž N-konce jsou lokalizovány v cytoplazmatickém a C-konce v periplazmatickém prostoru (Cogdell a Lindsay, 2000).

Základní stavební jednotkou antény LH2 je tedy dimer  $\alpha\beta$  se třemi nekovalentně vázanými molekulami BChl a jednou nebo dvěma (dle druhu bakterie) molekulami karotenoidu. Molekuly BChl jsou uspořádány do dvou úrovní. Monomerní Bchl *a* B800 (dávající absorpční maximum při 800 nm) je svým porfyrinovým skeletem vázán rovnoběžně s rovinou membrány na cytoplazmatické straně. Naproti tomu dimerní BChl *a* B850 (absorpční maximum při 850 nm) je umístěn kolmo na rovinu membrány na periplazmatické straně (viz obrázek 2-7). V závislosti na těchto dvou typech BChl *a* poskytují komplexy LH2 ve spektru dvě absorpční maxima (Cogdell *et al.*, 1999).

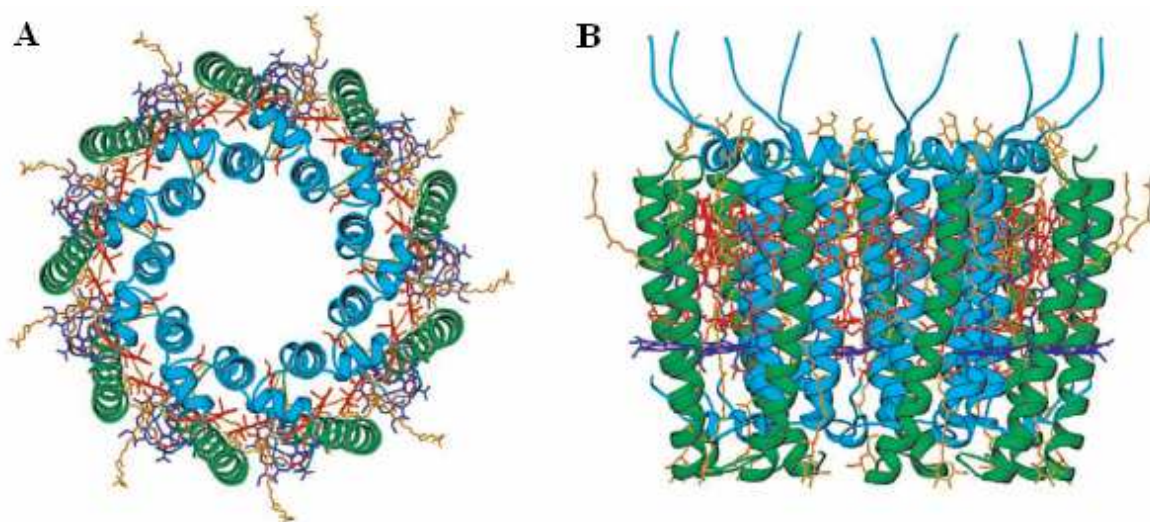


Obr. 2-7  
Základní podjednotka komplexu LH2 z purpurové bakterie *Rhodopseudomonas acidophila*. Barevné rozlišení: polypeptid  $\alpha$  – tmavě modrá, polypeptid  $\beta$  – světle modrá, karotenoid – oranžová, dimerní BChl *a* B850 – zelená, monomerní BChl *a* B800 – červená. (převzato z Law *et al.*, 2004)

Vnější anténa LH2 je složena z devíti dimerů  $\alpha\beta$  uspořádaných v kruhové symetrii tak, že vnitřní stěnu tohoto válce tvoří  $\alpha$ -helixy apoproteinu  $\alpha$  a vnější stěnu  $\alpha$ -helixy apoproteinu  $\beta$ . Výsledná struktura tak představuje nonamer  $\alpha_9\beta_9$  (viz obrázek 2-8 na následující straně). V tomto nonameru je vázáno 27 molekul BChl *a*, přičemž 9 molekul BChl *a* (B800) leží po obvodu antény mezi jednotlivými apoproteiny  $\beta$  a 18 molekul BChl *a* (B850) je umístěno střídavě mezi  $\alpha$ -helixy apoproteinu  $\alpha$  a  $\beta$  (Cogdell *et al.*, 1999).

Výše zmíněný model komplexu LH2 je typický pro AnAP. Ovšem v případě AAP, pokud je LH2 přítomen, můžeme nalézt určité odlišnosti. Tyto rozdíly se projevují především v posunutí absorpčních maxim BChl *a*. Například rody *Erythromicrobium* a

*Sandarakinorhabdus* vykazují absorpční vrcholy pro BChl *a* v LH2 při 798 a 832 nm (Yurkov a Beatty, 1998a; Gich a Overmann, 2006). Toto spektrální posunutí je způsobeno rotací molekuly BChl *a*, s čímž souvisí změna počtu vodíkových vazeb ukotvujících molekulu BChl *a* k polypeptidům  $\alpha$  a  $\beta$  antény LH2 (Yurkov a Beatty, 1998a; Yurkov a Csotonyi, 2009). Unikátní LH2 pozorovaná u AAP *Roseobacter denitrificans*, *Rubrimonas cliftonensis* a *Roseicyclus mahoneyensis* vykazuje jediné absorpční maximum při 806, respektive 805 nm (Shimada, 1995; Suzuki *et al.*, 1999; Rathgeber *et al.*, 2005).



Obr. 2-8

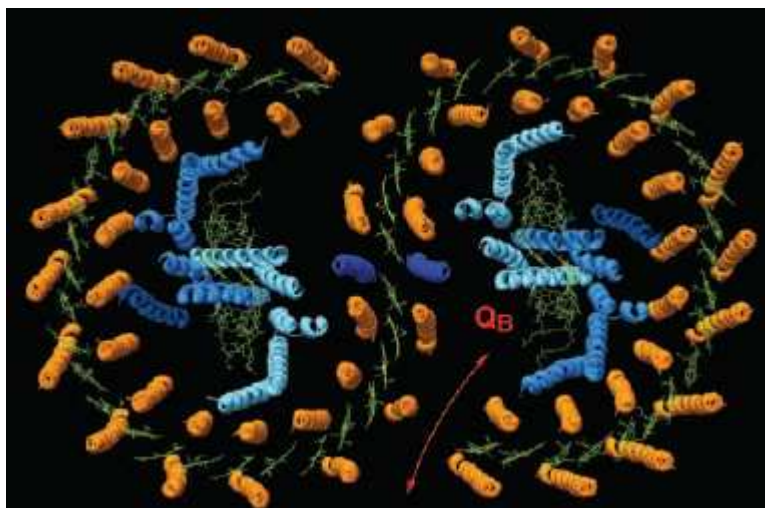
Struktura komplexu LH2 purpurové bakterie *Rhodospseudomonas acidophila*. A) Pohled shora dolů z periplazmatické strany membrány. B) Pohled ze strany s periplazmatickou stranou membrány nahore. Barevné rozlišení: polypeptid  $\alpha$  – tyrkysová, polypeptid  $\beta$  – zelená, karotenoid – oranžová, B850 – červená, B800 – modrá. (převzato z Law *et al.*, 2004)

Vnitřní LH1 má podobnou strukturu jako LH2, opět je základní jednotkou dimer  $\alpha\beta$ , na který však připadají pouze dvě molekuly BChl *a* a jedna či dvě (dle druhu bakterie) molekuly karotenoidu. Rozmístění bakteriochlorofylů je jednoúrovňové a proto LH1 poskytuje ve spektru pouze jedno absorpční maximum, obvykle při 870 nm. Dimerní BChl *a* je umístěn v membráně ve stejné hloubce jako BChl *a* B850 v LH2 (Law *et al.*, 2004).

Předpokládá se, že celková struktura LH1 je kruhově symetrická, tento „kruh“ je však nepochybně větší než v případě LH2. Podle prvního modelu se LH1 skládá z 12 dimerů  $\alpha\beta$ , v nichž je zabudováno 24 molekul BChl *a* (Meckenstock *et al.*, 1992a; Meckenstock *et al.*, 1992b). Pravděpodobnější model počítá se 16 dimery  $\alpha\beta$  (Karrasch *et al.*, 1995), čímž vzniká dostatečně velká dutina pro obklopení RC (viz obrázek 2-6 na straně 28). Počet BChl *a* vázaných v LH1 by pak měl odpovídat 32 molekulám. V počtu molekul BChl *a* zabudovaných ve světlosběrném systému se však jednotlivé studie liší (Cogdell *et al.*, 1999). Utváří tedy LH1 okolo reakčního centra opravdu kruh?



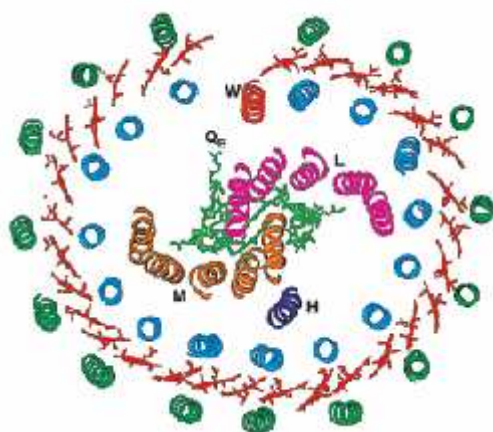
Na základě pozorování nativních izolovaných membrán purpurové bakterie *Rhodobacter sphaeroides* pomocí elektronové a atomové mikroskopie byl navržen model, který zobrazuje komplex LH1-RC jako ne zcela uzavřený kruh, tedy spíše jakýsi oblouk (Jungas *et al.*, 1999; Bahatyrova *et al.*, 2004). Tato nová teorie byla potvrzena objevem dosud neznámého proteinu



Obr. 2-9

Model dimerního LH1-RC purpurové bakterie *Rhodobacter blasticus*. Jeden monomer obsahuje 1 PufX (modrý  $\alpha$ -helix v LH1), 1 RC, 13 dimerů  $\alpha\beta$  (oranžové  $\alpha$ -helixy). Šipka naznačuje výměnu elektronů pomocí ubichinonu. (převzato z Scheuring *et al.*, 2005)

PufX. PufX je včleněn do struktury antény LH1 tak, že zabraňuje uzavření kruhu, dokonce může asociovat s druhým PufX, čímž vznikne dimerní komplex LH1-RC (viz obrázek 2-9). Tento protein hraje klíčovou roli ve fotosyntéze, neboť umožňuje výměnu elektronů zprostředkovanou ubichinonem mezi reakčním centrem a cyt  $bc_1$  (Scheuring *et al.*, 2004).



Obr. 2-10

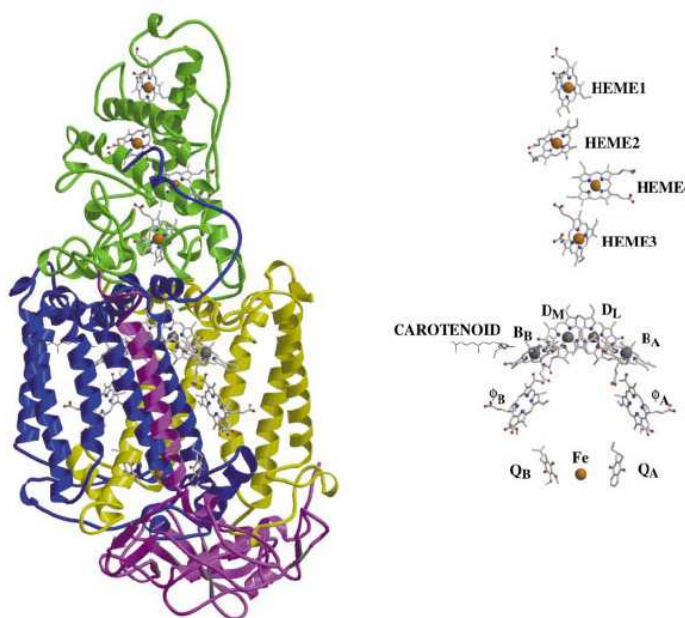
Struktura komplexu LH1-RC purpurové bakterie *Rhodospseudomonas palustris*. Protein W (červený  $\alpha$ -helix) brání úplnému uzavření oválné antény LH1. (převzato z Law *et al.*, 2004)

Komplex LH1-RC AAP je strukturně velmi podobný výše popsanému komplexu AnAP, zatím u žádné AAP však nebyla prokázána přítomnost proteinu PufX nebo W. U bakterií rodu *Acidiphilium* pozorujeme posun v absorpčním maximu LH1 způsobený přítomností Zn-BChl *a* místo obvyklého Mg-BChl *a* (Yurkov a Csotonyi, 2009).

### 2.3.2 Reakční centrum

Fotosyntetické reakční centrum (RC) je definováno jako minimální funkční jednotka, která katalyzuje světlem indukovaný přenos elektronů vedoucí ke stabilnímu rozdělení nábojů. Tento integrální membránový komplex tedy hraje zásadní roli ve fotosyntetických procesech přeměny světelné energie na energii chemickou (Yurkov a Beatty, 1998a). Jak již bylo uvedeno dříve, fotosyntetické komplexy AAP jsou syntetizovány v podstatně menším množství než u AnAP. To ztěžuje jejich izolaci a charakterizaci (Shimada, 1995; Yurkov a Beatty, 1998a; Yurkov a Csotonyi, 2009). Naštěstí genová sekvence RC u AAP je velmi podobná genům z AnAP, drobné modifikace vyžaduje pouze přizpůsobení anoxygenní fotosyntézy aerobním podmínkám (Yutin a Bějá, 2005). Proto využijí model RC purpurových bakterií i pro popis RC AAP.

Jedná se o RC typu 2 (chinonový typ), které se skládá ze tří hlavních strukturních podjednotek H, M a L, čtyř molekul BChl *a*, dvou molekul BPhe *a*, dvou molekul ubiquinonu, jednoho nehemově vázaného iontu železa a jedné molekuly karotenoidu. RC některých fototrofních bakterií obsahuje ještě čtvrtou podjednotku C, která představuje na RC těsně vázaný tetrahemový cyt *c* (viz kapitola 2.2.2) (Yurkov a Beatty, 1998a). Struktura RC purpurové bakterie *Rhodopseudomonas viridis* je patrná z obrázku 2-11.



Obr. 2-11

Schematický model struktury (vlevo) a kofaktorů (vpravo) RC purpurové bakterie *Rhodopseudomonas viridis*. Podjednotky RC: H – fialová, M – modrá, L – žlutá, C – zelená. Kofaktory RC: D<sub>M</sub>, D<sub>L</sub> – zvláštní pár BChl *a*, B<sub>B</sub>, B<sub>A</sub> – BChl *a*, Φ<sub>B</sub>, Φ<sub>A</sub> – BPhe *a*, Q<sub>B</sub>, Q<sub>A</sub> – ubiquinon, Fe – nehemový ion železa, HEME 1, 2, 3 a 4 – tetrahem cyt *c*. (převzato z Lancaster a Michel, 2001)



Podjednotky RC H (heavy), M (medium) a L (light) byly pojmenovány na základě své pohyblivosti při SDS-PAGE, toto označení je však nesprávné, přesto se používá (Cogdell a Lindsay, 2000). Analýza aminokyselinové sekvence odhalila skutečné velikosti těchto podjednotek. Ve skutečnosti největší molekulovou hmotnost má podjednotka M (35,9 kDa), následuje podjednotka L (30,5 kDa) a paradoxně nejmenší je podjednotka H (28,4 kDa). *Rhodopseudomonas viridis* obsahuje ještě podjednotku C (40,5 kDa) (Lancaster a Michel, 2001).

Podjednotky L a M tvoří vlastní jádro RC, obě mají pět  $\alpha$ -helixů, kterými jsou ukotveny v cytoplazmatické membráně. Nekovalentně váží fotosyntetické kofaktory, které jsou rozděleny do dvou téměř symetrických větví A a B, společné jsou dvě molekuly BChl *a* vytvářející tzv. zvláštní pár, každá větev dále obsahuje jednu molekulu BChl *a*, jednu molekulu BPhe *a* a jeden ubiquinon. Tuto dvoučetnou symetrii narušuje karotenoid vázaný na větví B. Nehemový ion železa je umístěn mezi oběma molekulami ubiquinonu (viz obrázek 2-11 na předcházející straně) (Cogdell a Lindsay, 2000; Lancaster a Michel, 2001). Zajímavé je, že aktivní v elektronovém přenosu jsou pouze kofaktory větve A, jež váže podjednotka L (Cogdell a Lindsay, 2000).

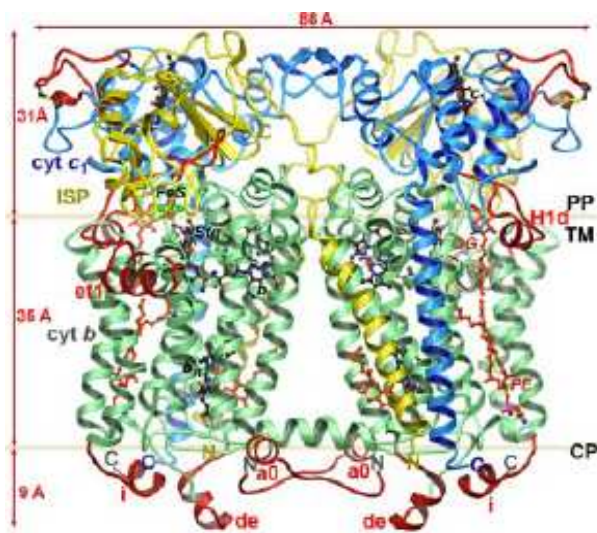
Podjednotka H je ukotvena v membráně pouze jedním  $\alpha$ -helixem, lokalizována je hlavně na cytoplazmatické straně membrány a neváže žádné kofaktory, tudíž nemá funkci v přenosu elektronů (Cogdell a Lindsay, 2000). Přesto plní nepostradatelnou úlohu ve fotosyntéze, je totiž odpovědná za stabilitu celého RC a dokonce je považována za základací protein pro syntézu ostatních podjednotek RC (Cheng *et al.*, 2000).

Podjednotka C má charakter lipoproteinu a v membráně je ukotvena kovalentní thioetherovou vazbou k cysteinovému zbytku na N-konci polypeptidového řetězce, její čtyři hemy jsou jako jediné kofaktory RC vázány kovalentně (Lancaster a Michel, 2001).

### 2.3.3 Komplex cyt *bc*<sub>1</sub>

Komplex cyt *bc*<sub>1</sub> nezařazujeme do fotosyntetického aparátu jako takového, přesto patří mezi integrální membránové proteiny plnící důležitou úlohu ve fotosyntetických procesech přenosu elektronů. Cyt *bc*<sub>1</sub> představuje největší zdroj protonů translokovaných přes membránu, které jsou dále využity k tvorbě ATP (Esser *et al.*, 2008).

Bakteriální cyt *bc*<sub>1</sub> je strukturně podobný svému mitochondriálnímu protějšku, skládá se ze tří nebo čtyř podjednotek (dle druhu bakterie): cyt *b*, cyt *c*<sub>1</sub>, FeS proteinu a



případně podjednotky IV. Rozdíl mezi mitochondriálním a bakteriálním cyt  $bc_1$  spočívá především ve ztrátě či vsunutí určitých strukturních motivů. Tyto motivy se vyskytují v blízkosti cytoplazmatické či periplazmatické strany membrány, nikdy ne uvnitř membrány (viz obrázek 2-12). Původ těchto strukturních rozdílů nalezneme v evolučním procesu přeměny bakteriálního cyt  $bc_1$  na jeho mitochondriální ekvivalent (Esser *et al.*, 2008).

Obr. 2-12

Struktura dimeru komplexu cyt  $bc_1$  z purpurové bakterie *Rhodobacter sphaeroides*. Podjednotky: cyt  $b$  – zelená, cyt  $c_1$  – modrá, FeS protein – žlutá. Červeně jsou označeny strukturní motivy odlišující bakteriální a mitochondriální cyt  $bc_1$ . Hranice lipidové dvojvrstvy je označena dvěma paralelními čarami. Zkratky: PP – periplazmatický prostor, CP – cytoplazmatický prostor, TM – vnitřní prostor membrány. (převzato z Esser *et al.*, 2008)

## 2.4 Anoxygení fotosyntéza v aerobních podmínkách

Anoxygení fotosyntéza je velmi starý proces, který se vyvinul cca před třemi miliardami lety, přibližně jednu miliardu let před oxidací atmosféry (Xiong a Bauer, 2002). Předpokládalo se tak, že bakteriální fotosyntéza vykonávaná anaerobními bakteriemi je čistě anaerobní proces, silně inhibovaný přítomností kyslíku (Yutin a Bějá, 2005). Naprosto průlomový byl tedy objev AAP obsahujících BChl  $a$ , který je zabudován v plně funkčním fotosyntetickém aparátu (Shiba *et al.*, 1979). Jak je ovšem možné, že jsou AAP schopné fotosyntetizovat v aerobních, nikoliv však v anaerobních podmínkách?

Prvním důvodem je vysoký redoxní potenciál primárního akceptoru RC  $Q_A$ . Tyto hodnoty se u AAP pohybují v rozmezí od 5 do 150 mV, zatímco u AnAP jsou záporné. Kvůli tomuto vysokému redoxnímu potenciálu by byl primární akceptor v anaerobním prostředí stále v redukované formě jako ubiquinol, neschopný tak přijmout elektrony. Ovšem v přítomnosti kyslíku jako silného oxidantu je primární akceptor držen ve formě oxidovaného ubiquinonu a je tudíž schopen příjmu elektronu (Yurkov a Beatty, 1998a). Dalším důvodem může být neschopnost cyt  $c_2$  přenášet elektrony z cyt  $bc_1$  na tetrahemový

cyt *c* v anaerobních podmínkách, čímž nedojde k redukci fotooxidovaného RC (Rathgeber *et al.*, 2004). Mechanismus těchto reakcí, stejně tak jako příčina vysokého redoxního potenciálu ubiquinonu  $Q_A$  zatím nejsou zcela jasné (Yurkov a Csotonyi, 2009).

### 2.4.1 Přenos energie uvnitř fotosyntetické jednotky

K zachycení světelného kvanta dochází prostřednictvím pigmentů nekovalentně vázaných ve světlosběrném systému. Tato energie musí být následně přenesena do RC, kde je využita k fotooxidaci zvláštního páru BChl *a*, čímž se nastartuje vlastní fotosyntetický proces přenosu elektronů (Cogdell a Lindsay, 2000).

Systém LH zde funguje jako jakýsi „trychtýř“ excitační energie směřující přímo k RC a zajišťující tak maximální účinnost přenosu. Tento přenos energie je řízen energetickým gradientem vycházejícím z LH2 směrem k LH1 (B800 → B850 → B875) a dále do RC. Důležitá je doba života excitovaného elektronového singletního stavu BChl *a*, tedy asi 1 ns, a právě tento časový interval musí být dodržen i při přenosu energie až do RC (Law *et al.*, 2004).

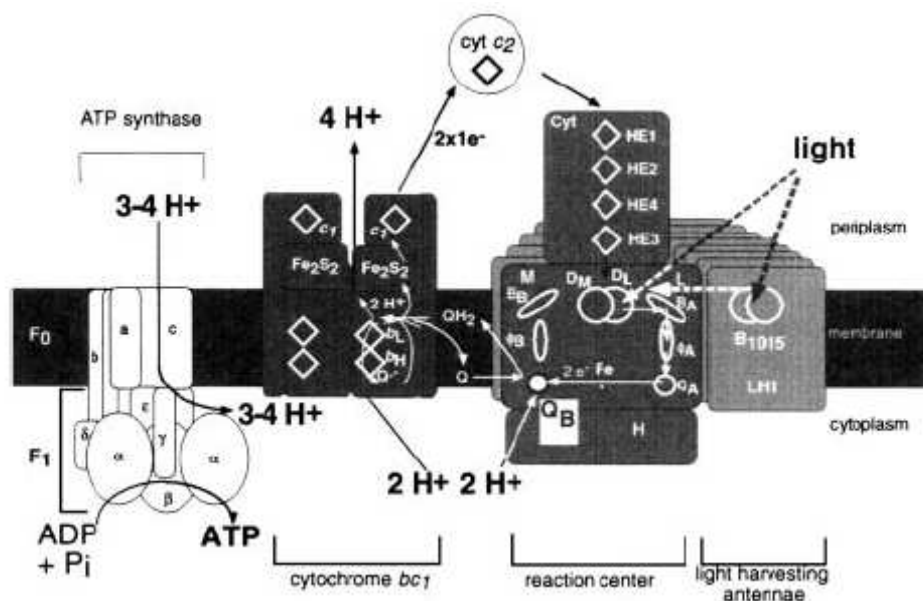
Zde ovšem narážíme na problém funkce karotenoidů jako světlosběrných pigmentů, neboť jejich fluorescenční doba života je velmi krátká. Přesto se účinnost přenosu energie karotenoid → BChl *a* pohybuje (dle druhu bakterie) v rozmezí 30–100 % (Cogdell *et al.*, 1999). Řešením může být neobvyklá fotochemie karotenoidů, mají totiž dva excitované stavy,  $S_1$  a  $S_2$ . Symetricky dovolený je pouze přechod ze základního stavu  $S_0$  na excitovaný stav  $S_2$ , stav  $S_1$  tak může být za normálních podmínek populován pouze vnitřní konverzí z  $S_2$ . K přenosu energie karotenoid → BChl *a* tedy dochází dvěma cestami, tj. vysokoenergetickým přechodem  $S_2 \rightarrow Q_X$  a nízkoenergetickým přechodem  $S_1 \rightarrow Q_Y$  ( $Q_X$  a  $Q_Y$  jsou dvě energetické hladiny BChl *a*). Zcela přesný mechanismus těchto energetických přenosů však znám není (Cogdell *et al.*, 1999; Fraser *et al.*, 2001).

Klíčovou roli při přenosu energie mezi BChl *a* systémem LH-RC hraje jejich pozice v membráně, BChl *a* B850 a B875 a BChl *a* zvláštního páru jsou umístěny na stejné úrovni, což maximalizuje účinnost energetického přenosu (Law *et al.*, 2004). Po absorpci světelného kvanta anténou LH2 dochází nejprve k přechodům uvnitř LH2, jednak k jednoúrovňovým přechodům mezi BChl *a* B800 (500 fs), a dále k přechodům B800 → B850 (1,2 ps). Excitovaný stav na B850 se náhle stává delokalizovaným, energie se tak může přenést z kterékoliv části „kruhu“ na jakýkoliv sousední „kruh“. Další přenos

z B850 na B875 antény LH1 už je pomalejší (3–5 ps), opět dochází k delokalizaci na B875. Nejpomalejší je přenos z B875 na zvláštní pár BChl *a* (35 ps), to je dáno větší vzdáleností mezi BChl *a* LH1 a RC. Důvodem této relativně větší vzdálenosti je následující kompromis: vzdálenost je dostatečně malá na to, aby došlo k účinnému přenosu energie, zároveň je však dostatečně velká k tomu, aby nedošlo ke zpětnému elektronovému přenosu z RC na LH1 (Sundström *et al.*, 1999; Law *et al.*, 2004).

## 2.4.2 Systém přenosu elektronů

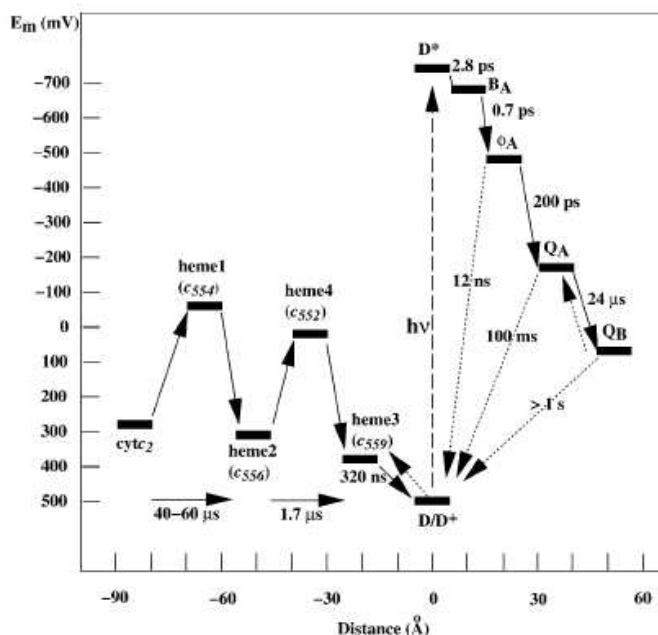
Absorpce fotonů světlosběrným systémem a následný transport energie do RC vede k excitaci primárního donoru, tedy zvláštního páru BChl *a*, z něhož se tak stává silné redukční činidlo. Tím se nastartuje cyklický tok elektronů, který je spřažen s transportem protonů přes membránu do periplazmatického prostoru (viz obrázek 2-13) (Yurkov a Beatty, 1998a).



Obr. 2-13

Schematický model cyklického toku elektronů v purpurové bakterii *Rhodospseudomonas viridis*. Detailní popis je uveden v textu. (převzato z Lancaster a Michel, 2001)

Z excitovaného primárního donoru ( $D^*$ ) je elektron přenesen přes monomerní BChl *a* ( $B_A$ ) a BPhe *a* ( $\Phi_A$ ) na primární akceptor ( $Q_A$ ), jímž je u AAP ubiquinon  $Q_{10}$ . To vede k vytvoření  $D^+Q_A^-Q_B$ , v této fázi následuje reredukce oxidovaného  $D^+$  hemem 3, jenž je součástí tetrahemového cyt *c*. Tento proces nazýváme „fotochemickou cytochromovou



Obr. 2-14

Graf rovnovážných redoxních potenciálů kofaktorů RC z purpurové bakterie *Rhodospirillum rubrum* jako funkce vzdálenosti jednotlivých kofaktorů od zvláštního páru BChl *a*. Přenos elektronů s uvedenými časy přenosu je označen plnou šipkou, fotochemická excitace přerušovanou šipkou a nefyziologické rekombinační reakce nábojů znázorňuje šipka tečkovaná. (převzato z Lancaster a Michel, 2001)

$DQ_A Q_B H_2$ . Ubichinol  $Q_B H_2$  následně opouští vazebné místo a je reoxidován dalším membránovým proteinovým komplexem cyt  $bc_1$  (Lancaster a Michel, 1999; Lancaster a Michel, 2001). Dosavadní proces je velmi dobře patrný z obrázku 2-14, ovšem jedná se pouze o orientační graf, neboť hodnoty redoxních potenciálů kofaktorů v RC purpurových bakterií a AAP se mohou značně lišit.

Funkcí komplexu cyt  $bc_1$  je tedy přenést elektrony z  $Q_B H_2$  dále na cyt  $c_2$ , s čímž souvisí i přenos protonů z cytoplazmatické strany membrány na stranu periplazmatickou. Děje se tak složitým mechanismem, jenž ještě není zcela prostudován. Předpokládá se však, že  $Q_B H_2$  putuje do ubiquinonové hotovosti v membráně, kde je vyměněn za reoxidovaný  $Q_B$ , jenž se vrací zpět do RC. Fyzickou proveditelnost této výměny vysvětluje nový strukturní model LH1 antény (viz kapitola 2.3.1). Komplex cyt  $bc_1$  pracuje mechanismem tzv. Q-cyklu, tj.  $Q_B H_2$  je oxidován chinoloxidasovou reakcí, při níž hrají důležitou roli dva hemy cyt  $b$  (nizkopotenciálový  $b_L$  a vysokopotenciálový  $b_H$ ). Oxidovaný  $Q_B$  se vrací do ubiquinonové hotovosti a dále zpět do RC, přičemž uvolněné protony

oxidací“, zvláštní pár BChl *a* se tak opět dostává do svého základního stavu a vzniká  $DQ_A^- Q_B^-$ . Další krok zahrnuje přenos prvního elektronu na  $Q_B$ , což vede ke vzniku semichinonové formy  $DQ_A Q_B^-$ . Mezitím dochází k reredukci hemu 3 prostřednictvím hemu 2. Celý tetrahemový cyt *c* je pak reredukován cyt  $c_2$ . Poté se celý cyklus opakuje a dochází tedy k další excitaci zvláštního páru BChl *a* a k přenosu druhého elektronu za vzniku  $DQ_A^- Q_B^-$ . Následuje příjem nejprve prvního protonu, čímž dojde k tvorbě přechodného  $DQ_A (Q_B H)^-$  a poté druhého protonu, což vede k tvorbě plně redukovaného

procházejí přes membránu do periplazmatického prostoru. Elektron dále migruje přes Rieskeho  $\text{Fe}_2\text{S}_2$  protein a cyt  $c_1$  až na cyt  $c_2$ , který se pohybuje v periplazmatickém prostoru (Schwarze *et al.*, 2000). K reredukci oxidovaného  $\text{D}^+$  dochází v závislosti na druhu bakterie buď samotným cyt  $c_2$  dvoufázovou reakcí nebo prostřednictvím tetrahemového cyt  $c$  (viz obrázek 2-14 na předcházející straně), tím se celý cyklus přenosu elektronů uzavírá, zvláštní pár BChl  $a$  se vrací do svého základního stavu a celá kaskáda se může opakovat (Lancaster a Michel, 2001).

### 2.4.3 Fotofosforylace

Protony, které byly během reakcí přenosu elektronů transportovány do periplazmatického prostoru, jsou následně využity k tvorbě ATP v procesu zvaném fotofosforylace. Stejně jako v dýchacím řetězci nebo v procesu oxygenní fotosyntézy se i zde jedná o syntézu ATP z ADP a anorganického fosfátu vyrovnáváním gradientu elektrochemického potenciálu protonů. To je zajišťováno dalším membránovým proteinem, ATP-synthasou (viz obrázek 2-13 na straně 36) (Zubkov, 2009). Fotofosforylace prováděná AAP je utlumena v anaerobních podmínkách (Okamura *et al.*, 1986). Konečným produktem anoxygenní fotosyntézy vykonávané aerobními anoxygenními fototrofy je tedy ATP, který je dále využíván v nejrůznějších buněčných metabolických procesech.

### 3 Heterotrofní metabolismus AAP

Z hlediska fototrofního metabolismu si jsou AAP a AnAP velice podobné, to se však již nemůže tvrdit při pohledu na heterotrofní metabolismus. AnAP totiž využívají světlo jako hlavní zdroj energie pro růst, zatímco organický substrát jim slouží pouze jako pomocná síla pro biosyntetické anabolické reakce. Oproti tomu pro AAP je hlavním zdrojem energie pro růst a všechny biosyntetické děje nezávislé na světle právě organický substrát (Yurkov a Beatty, 1998a).

#### 3.1 Zdroj organického uhlíku

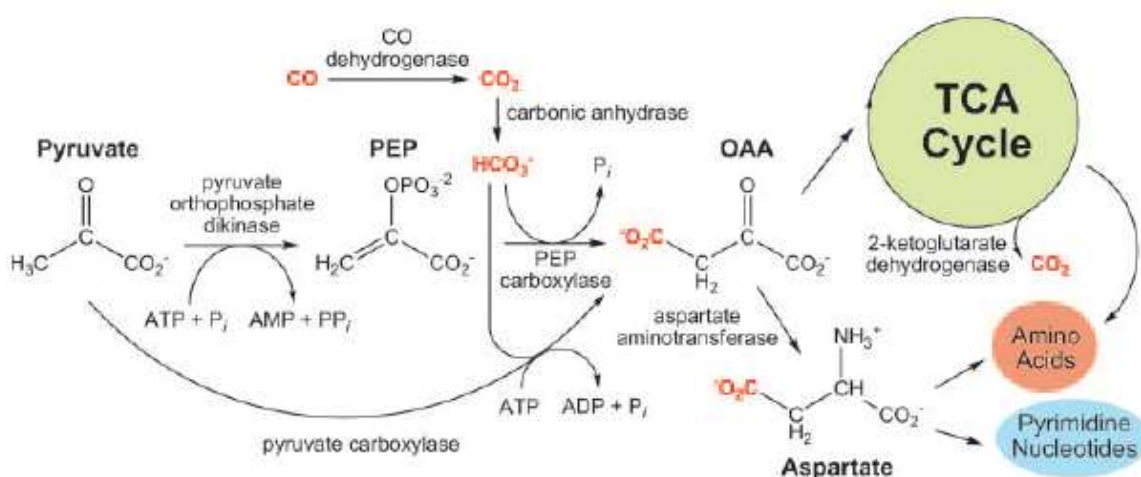
Většina AAP je schopna ke svému růstu využívat poměrně širokou paletu organických substrátů. Proto se ke kultivaci často používá komplexní bohaté organické médium, např. kvasinkový extrakt, pepton nebo kaseinový hydrolyzát (Yurkov a Beatty, 1998a). Podmínkou oxidace těchto organických substrátů je vždy přítomnost kyslíku, jenž stimuluje spotřebu substrátů, aktivuje heterotrofní růst a podporuje další metabolické reakce (Yurkov, 2006). Rody *Erythrobacter*, *Erythromicrobium*, *Porphyrobacter*, *Roseicyclus*, *Roseobacter* a *Sandaracinobacter* můžou metabolizovat také cukry, trikarboxylové kyseliny, mastné kyseliny a aminokyseliny (Yurkov a Csotonyi, 2009). U rodu *Erythromicrobium* byl zaznamenán i růst v nízkých koncentracích ethanolu (Yurkov *et al.*, 1994). Popsána byla dokonce hydrolýza želatiny a škrobu (Yurkov a Beatty, 1998a).

Aktivní růst AAP v komplexním médiu s vysokým obsahem organických sloučenin je plně v souladu s tím, že většina AAP byla izolována z eutrofního prostředí (Shiba *et al.*, 1979; Shiba *et al.*, 1991; Fuerst *et al.*, 1993; Yurkov a Beatty, 1998a). Samozřejmě i zde nalezneme výjimky, jedná se především o rod *Acidiphilium*, jenž roste nejlépe v médiu s relativně nízkými koncentracemi živin (Wakao *et al.*, 1996). Kmeny izolované především ze slaných jezer a slaných pramenů jsou z hlediska spotřeby organických substrátů více specializované, rostou hlavně v kvasinkovém extraktu či kaseinovém hydrolyzátu (Yurkova *et al.*, 2002). Také druh *Citromicrobium bathyomarinum* je schopen růstu pouze v nízkém počtu substrátů, nejlépe v glutamátu, butyrátu a kvasinkovém extraktu (Yurkov *et al.*, 1999). Tyto výjimky jsou způsobeny neobvyklými životními podmínkami, v nichž zmíněné bakterie žijí (Yurkov a Csotonyi, 2009).

### 3.2 Fixace CO<sub>2</sub>

Jak již bylo uvedeno dříve, AAP nejsou schopny autotrofně fixovat CO<sub>2</sub> (Yurkov a Beatty, 1998a). Experimenty s radioaktivně značeným <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> však indikovaly určitý nízký stupeň jeho asimilace, přičemž naměřené hodnoty jsou v souladu s heterotrofní fixací CO<sub>2</sub> (Kolber *et al.*, 2001).

V genomu AAP *Roseobacter denitrificans* byla potvrzena přítomnost genů kódujících dva enzymy, které jsou odpovědné za heterotrofní asimilaci CO<sub>2</sub>, tj. pyruvát-orthofosfátdikinasa a fosfoenolpyruvátkarboxylasa. CO<sub>2</sub> (ve formě HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) může být do oxalacetátu začleněn dvěma způsoby, buď reakcí s fosfoenolpyruvátem (fosfoenolpyruvátkarboxylasa) nebo přímo s pyruvátem (pyruvátkarboxylasa). Vzniklý oxalacetát poté vstupuje do citrátového cyklu. Na základě sekvence genomu bylo navrženo, že fixace CO<sub>2</sub> probíhá u AAP mixotrofně, neboť byl objeven enzym karbonyldehydrogenasa, který oxidační CO na CO<sub>2</sub> (viz obrázek 3-1) (Swingley *et al.*, 2007).



Obr. 3-1

Model mixotrofního mechanismu asimilace CO<sub>2</sub> u AAP *Roseobacter denitrificans*. (převzato z Swingley *et al.*, 2007)

### 3.3 Akumulace látek v buňkách

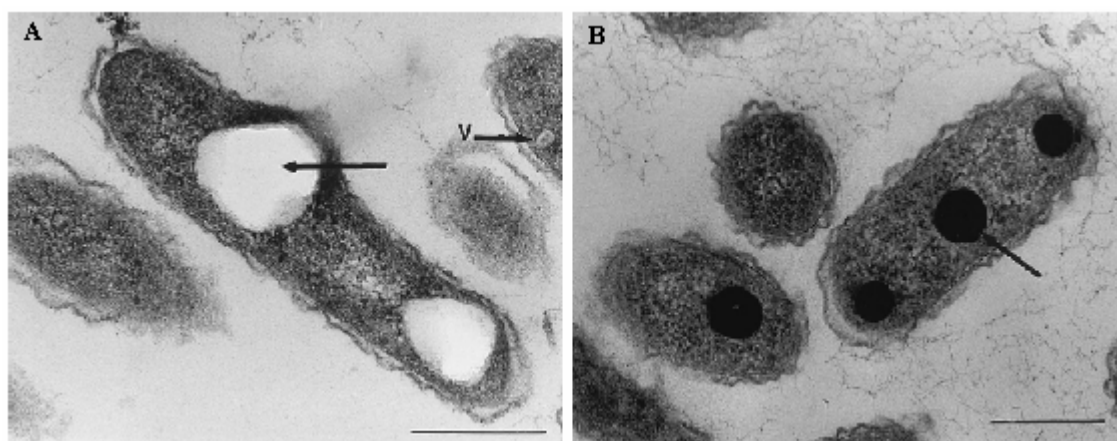
Bakterie obecně tvoří rozmanité cytoplazmatické inkluze. Mnohá inkluzní tělíska uskladňují energeticky bohaté substráty nebo slouží jako rezervoár pro buněčné stavební materiály (Mas a van Gemerden, 1995).



AAP akumulují v závislosti na podmínkách růstu a složení růstového média polysacharidy (např. glykogen), polyhydroxyalkanoáty (např. polyhydroxybutyrát) a polyfosfáty (Yurkov a Beatty, 1998a).

Schopnost akumulovat tyto materiály má mnoho druhů AAP, avšak jako největší „akumulátor“ se jeví bakterie *Sandaracinobacter sibiricus*, u níž mohou granule polyhydroxybutyrátu zaujímat 40 až 50 % objemu buňky, čímž může dokonce docházet až k deformaci buňky (viz obrázek 3-2A). Tato bakterie je také schopna akumulovat polyfosfát, jenž pro buňku představuje zásobu anorganického fosfátu, polyfosfátové granule mohou tvořit 30 až 40 % objemu buňky (viz obrázek 3-2B) (Yurkov a Beatty, 1998a; Yurkov, 2006).

Přestože byla tato schopnost akumulace materiálů pozorována u mnoha druhů AAP, o podmínkách umožňujících akumulaci nebo naopak o spotřebě těchto cytoplazmatických inkluzí je známo velice málo (Yurkov a Beatty, 1998a).



Obr. 3-2

Snímky z elektronového mikroskopu AAP *Sandaracinobacter sibiricus*. A) Šipka označuje inkluzi polyhydroxybutyrátu, šipka s písmenem V směřuje na vzácnou intracytoplazmatickou membránu. B) Šipka označuje inkluzi polyfosfátu.

Měřítka: 0,5  $\mu\text{m}$  (převzato z Yurkov a Beatty, 1998a)

### 3.4 Alternativní metabolické přístupy

Naprostá většina AAP používá jako donory elektronů redukované sloučeniny uhlíku, avšak několik druhů dokáže využít redukované sloučeniny síry jako alternativní zdroj elektronů (Yurkov a Csotonyi, 2009). Tyto druhy AAP jsou fylogeneticky úzce příbuzné purpurovým bakteriím, které používají elektrony získané oxidací sulfanu, thiosíranu a elementární síry pro fixaci  $\text{CO}_2$  a další metabolické pochody (Brune, 1995).

Například u AAP *Acidiphilium acidophilum*, *Roseococcus thiosulfatophilus*, *Rubritepida flocculens* a *Roseinatronobacter thiooxidans* a *monicus* byla prokázána oxidace thiosíranu, která vede v aerobních podmínkách k posílení heterotrofního růstu (Yurkov a Beatty, 1998a, Sorokin *et al.*, 1999; Rohwerder a Sand, 2003; Boldareva *et al.*, 2007; Yurkov a Csotonyi, 2009). Bakterie *Acidiphilium acidophilum* oxiduje přes glutathion dokonce i elementární síru (Rohwerder a Sand, 2003).

AAP jsou popsány jako bakterie, které dokáží růst pouze v přítomnosti kyslíku, ovšem i zde nalezneme výjimky. Několik druhů je schopno anaerobního chemo-heterotrofního růstu tak, že kyslík nahradí alternativním elektronovým akceptorem (Yurkov a Csotonyi, 2009). *Dinoroseobacter shibae* je schopna redukovat dusičnany (Biebl *et al.*, 2005a), *Roseobacter denitrificans* dokáže redukovat dusičnany, dusitany a trimethylamin-N-oxid (Shimada, 1995). Velmi zajímavá je na pH závislá redukce  $\text{Fe}^{3+}$  pozorovaná u AAP *Acidiphilium acidophilum*, tato schopnost může najít uplatnění při neutralizaci kyselých odpadních vod důlních systémů (Marchand a Silverstein, 2003).

### 3.5 Redukce oxidů těžkých kovů aneb potenciál pro bioremediace

V současné době přispívá ke znečišťování životního prostředí uvolňování ohromného množství toxických látek do okolí, především z průmyslových závodů. Bakteriální bioremediace může představovat přírodní a finančně lákavé řešení odstraňování těchto průmyslových kontaminací. Mechanismus spočívá v detoxikaci sloučenin těžkých kovů srážením, adsorpcí nebo přeměnou na méně toxické formy (Yurkov a Beatty, 1998a).

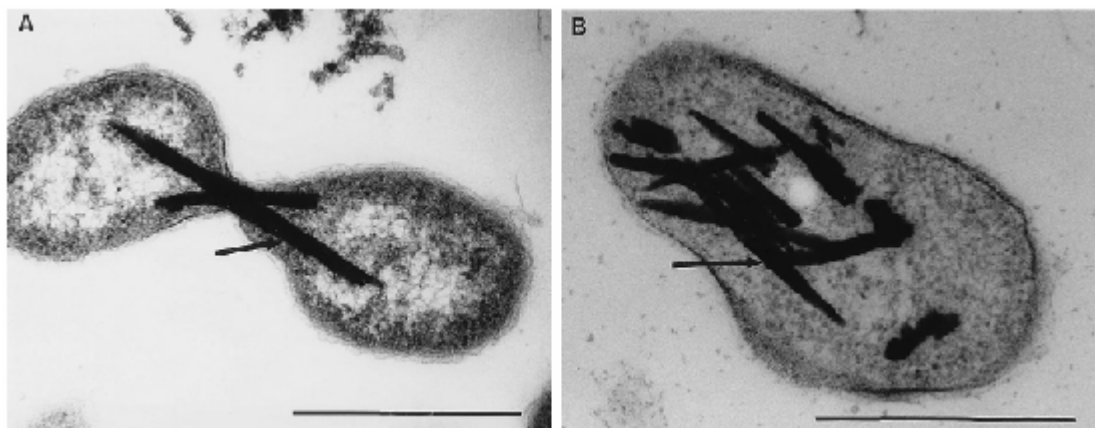
Existují mikroorganismy, které dokáží využít některé sloučeniny kovů ( $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Mn}^{4+}$ ,  $\text{U}^{6+}$ ,  $\text{Se}^{4+}$ ,  $\text{Te}^{4+}$ ,  $\text{V}^{5+}$  a  $\text{As}^{5+}$ ) jako terminální elektronové akceptory pro anaerobní respiraci (Lovley *et al.*, 1991; Laverman *et al.*, 1995; Yurkov a Beatty, 1998a; Rathgeber *et al.*, 2002; Csotonyi *et al.*, 2006). Purpurové fototrofní bakterie využívají oxidy kovů jako alternativní elektronové akceptory pro opětovnou oxidaci NADH, NADPH nebo  $\text{FADH}_2$  (Moore a Kaplan, 1992). V obou případech vznikají méně toxické sloučeniny těchto kovů (Yurkov a Beatty, 1998a).

Oxid telluričitý je toxický pro organizmy, včetně mnohých mikroorganismů, již při koncentracích  $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  (Yurkov a Beatty, 1998a). Sedm druhů AAP (*Erythromicrobium hydrolyticum*, *ramosum* a *ezovicum*, *Erythromonas ursincola*, *Erythrobacter litoralis*, *Sandaracinobacter sibiricus* a *Roseococcus thiosulfatophilus*) však vykazuje neobvykle

vysoký stupeň rezistence vůči telluričitanům. Například bakterie *Erythromonas ursincola* snáší koncentraci dosahující až  $2700 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  (Yurkov *et al.*, 1996), což je třeba třikrát více než u typické AnAP *Rhodobacter sphaeroides* ( $900 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) (Moore a Kaplan, 1992). Jak ovšem dochází k detoxikaci telluričitanů?

U bakterií *Roseococcus thiosulfatophilus* a *Erythromicrobium ezovicum* tento mechanismus není zcela jasný. Pravděpodobně dochází k methylaci či komplexaci telluričitanů a následnému aktivnímu transportu ven z buňky (Yurkov *et al.*, 1996).

Ostatní AAP dokáží redukovat toxický telluričitan na relativně inertní tellur, který poté akumulují v buňkách v podobě krystalů telluru (viz obrázek 3-3). V buňkách bakterií *Erythromicrobium ramosum* a *Erythrobacter litoralis* mohou krystaly  $\text{Te}^0$  zaujímat 20 až 30 % objemu buňky, což je mnohonásobně více než bylo pozorováno u bakterií rodu *Pseudomonas*, bakterie *Escherichia coli* či *Rhodobacter sphaeroides* (Yurkov *et al.*, 1996).



Obr. 3-3

Snímky z elektronového mikroskopu. Produkty redukce telluričitanů, tj. akumulované krystaly telluru, jsou označeny šipkami. A) Krystaly  $\text{Te}^0$  brání úplnému rozdělení bakterie *Erythromicrobium ramosum* na dvě dceřiné buňky. B) Krystaly  $\text{Te}^0$  zaujímají až 30 % objemu buňky bakterie *Erythrobacter litoralis*.

Měřítka:  $0,5 \mu\text{m}$  (převzato z Yurkov a Beatty, 1998a)

AAP mají schopnost rezistence nejen vůči telluričitanům, ale také vůči seleničitanům, přičemž vliv ostatních sloučenin těžkých kovů na AAP je předmětem dalšího studia. To otevírá možnost využití AAP k odstraňování těchto škodlivin ze znečištěných průmyslových oblastí. Navíc schopnost redukce těchto sloučenin na elementární kovy může být využita i pro zpětné získávání kovů z průmyslového odpadu nebo z rud obsahujících příliš malá množství těchto kovů pro klasickou těžbu (Yurkov a Beatty, 1998a).

## 4 Cíl práce

Prvním úkolem bylo shrnout dostupné informace o aerobních anoxygenních fotoheterotrofních bakteriích. AAP charakterizuje neobvyklý aerobní fotosyntetický aparát. Proto se výzkum zaměřuje především na jejich fototrofní metabolismus.

Cílem této práce bylo nalézt účinný postup izolace a purifikace fotochemicky aktivních fotosyntetických komplexů z několika kmenů AAP. Dále tyto komplexy charakterizovat z hlediska proteinového a pigmentového složení a pigmentové stechiometrie a porovnat s anaerobní purpurovou bakterií *Rhodobacter sphaeroides*.

## 5 Materiál

### 5.1 Biologický materiál

V rámci této diplomové práce jsem pracoval s následujícími kulturami aerobních anoxygenních fototrofních bakterií, které byly pěstovány na pracovišti MBÚ AV ČR v Třeboni a Centra biologických technologií v Nových Hradech (Ústav fyzikální biologie, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích).

Bakterie *Roseobacter* (*Rsb.*) sp. COL2P, izolovaná z pobřežních vod Středozemního moře, mi byla poskytnuta Mgr. Michalem Koblížkem, Ph.D. (MBÚ AV ČR, Třeboň).

Bakterii *Erythrobacter* (*Erb.*) sp. NAP1, která byla izolovaná z povrchových vod severozápadního Atlantiku, mi poskytl Mgr. Alexander Dulebo (Centrum biologických technologií, Nové Hradky).

Mgr. Ekaterina Boldareva, Ph.D. (MBÚ AV ČR, Třeboň) mi poskytla kmeny Dor-2m, Dor-vul a Zun-kholbo, izolované ze slaných sodných jezer (Republika Burjatsko, Ruská federace). Tyto kmeny zatím nejsou fylogeneticky zařazeny, ovšem na základě sekvenční analýzy 16S rRNA vykazují 99% podobnost s AAP *Roseinatronobacter monicus* (Boldareva, osobní sdělení).

Pro srovnání jsem používal anaerobní purpurovou bakterii *Rhodobacter* (*Rba.*) *sphaeroides* pěstovanou Mgr. Michalem Koblížkem, Ph.D. (MBÚ AV ČR, Třeboň).

### 5.2 Seznam použitých chemikálií

Veškeré použité chemikálie byly v nejvyšší komerčně dostupné čistotě.

aceton, Penta, ČR

akrylamid, Serva, Německo

Coomassie Brilliant Blue R250 (CBB), Serva, Německo

N,N-dimethyldodecylamin-N-oxid (LDAO), Fluka, Švýcarsko

dodecylsírán sodný (SDS), Sigma, USA

ethyldiamintetraacetát (EDTA), Penta, ČR

fenylmethansulfonylfluorid (PMSF), Fluka, Švýcarsko

glycerol, Penta, ČR  
glycin, REANAL, Maďarsko  
chlorid měďnatý, Penta, ČR  
chlorid sodný, Penta, ČR  
chlorid vápenatý, Penta, ČR  
kyselina chlorovodíková, Penta, ČR  
kyselina octová, Penta, ČR  
2-merkaptoethanol, Fluka, Švýcarsko  
methanol, Penta, ČR  
N,N'-methylen-bis-akrylamid (Bis), Serva, Německo  
octan amonný, Penta, ČR  
peroxodisíran amonný (APS), Penta, ČR  
sacharosa, Penta, ČR  
Q/DEAE-Sepharose Fast Flow, GE Healthcare Bio-Sciences AB, Švédsko  
N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin (TEMED), Serva, Německo  
tris(hydroxymethyl)aminoethan (Tris), Serva, Německo

### **5.3 Seznam použitých přístrojů**

centrifuga Eppendorf centrifuge 5804 R, rotor F-34-6-38  
centrifuga Eppendorf Mini spin plus, rotor F-45-12-11  
centrifuga Sigma laboratory centrifuges 3K30, rotor 12159  
centrifuga Sorvall Evolution RC, rotor SA-300  
ultracentrifuga Beckman Coulter Optima LE-80K Ultracentrifuge, rotor SW 32 Ti  
fluorimetr FL-100, Photon Systems Instruments Ltd., ČR  
French press Carver model M, 12000-276, Hydraulic press equipment  
French press – cell disrupter, FA-032, Thermo electron corporation  
HPLC Agilent 1200 Series system, Agilent Technologies Inc., Palo Alto, CA, USA  
sada pro elektroforézu Biometra Whatman Minigel-Twin, G-42  
spektrofotometr Helios  $\alpha$ , 103103, v 4.60  
spektrofotometr Shimadzu, UV-2401PC  
spektrofotometr Shimadzu, UV-3000  
třepačka Elpan water bath shaker type 357

## 6 Metody

### 6.1 Kultivace

Všechny zásobní roztoky byly uloženy v lednici, růstová média byla sterilizována v autoklávu.

Bakteriální kultury *Erythrobacter* sp. NAP1 a *Roseobacter* sp. COL2P byly pěstovány v chemostatu (V ~ 750 ml) při 23 °C v cyklických intervalech světlo-tma 12 : 12 hodin s uhlíkovou limitací pro tvorbu fotosyntetických komplexů (Koblížek *et al.*, 2003; Koblížek *et al.*, 2010). Základem růstového média byla uměle připravená mořská voda doplněná o kyselinu glutamovou jako jediný zdroj organického uhlíku (složení viz tabulky 6-1, 6-2 a 6-3). Buněčná suspenze byla důkladně míchána a probublávána vzduchem. Růstové médium bylo pumpováno v 30minutových intervalech.

Tab. 6-1

Složení růstového média (pH 8,0) s uhlíkovou limitací pro bakterie NAP1 a COL2P.

Základní komponenty	c [mM] v médiu	m [g] na 1 liter média
NaCl	400	23,38
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	20	4,93
CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	10	1,11
KBr	1,7	0,2
KCl	10	0,75
MgCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	20	4,07
Kyselina glutamová	3	0,441
Další složky	c [M] v zásobním roztoku	V [ml] na 1 liter média
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , pH 8,0	0,1	1
(NH <sub>4</sub> )SO <sub>4</sub>	1	2,5
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,2	1
Selen	10 <sup>-5</sup>	1
Vitamíny	tab. 6-2	0,5
Kovy	tab. 6-3	1

Tab. 6-2

Složení zásobního roztoku vitamínů pro růstové médium z tab. 6-1.

Složka	1. zásobní roztok na 10 ml	Množství na 1 liter
Vitamín B <sub>12</sub>	10 mg	1 ml
Biotin, B <sub>7</sub>	10 mg	1 ml
Thiamin · HCl, B <sub>1</sub>	-	200 mg
Kyselina nikotinová, B <sub>3</sub>	-	250 mg

Tab. 6-3

Složení zásobního roztoku kovů pro růstové médium z tab. 6-1.

Složka	1. zás. roztok na 100 ml	Množství na 1 litr
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	980 mg	1 ml
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	2,2 g	1 ml
$\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	1,0 g	1 ml
$\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	18,0 g	1 ml
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	630 mg	1 ml
Chelatonát železit sodný (EDT-FeNa)	-	4 g

Kultivace kmenů Dor-2m, Dor-vul a Zun-kholbo probíhala v 500ml kónických baňkách v aerobních podmínkách za tmy při 23–28 °C. Složení růstového média je uvedeno v tabulce 6-4. Uvedené zásobní roztoky byly připraveny a sterilizovány odděleně a přidány do média bezprostředně před inokulací (Boldareva *et al.*, 2009).

Tab. 6-4

Složení růstového média (pH 9,0) pro kmeny Dor-2m, Dor-vul a Zun-kholbo.

Základní komponenty	c [%] v zásobním roztoku	Množství na 1 litr média
$\text{NH}_4\text{Cl}$	-	0,4 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	-	0,5 g
$\text{MgCl}_2$	-	0,2 g
$\text{Na}_2\text{SO}_4$	-	0,5 g
Kvasinkový extrakt	5	1 g
Octan sodný	10	1 g
Pyruvát sodný	10	1 g
$\text{NaCl}$	-	1 g
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	10	1 g
$\text{KCl}$	-	0,5 g
Vitamín B <sub>12</sub>	-	10 µg
Pfennigův roztok stopových prvků	-	1 ml

Bakteriální kultura *Rhodobacter sphaeroides* byla pěstována semiautotrofně v uzavřené nádobě ve tmě za současného krouživého třepání (Koblížek *et al.*, 2005b). Složení růstového média je uvedeno v tabulkách 6-5, 6-6 a 6-7.

Tab. 6-5

Složení růstového média pro bakterii *Rhodobacter sphaeroides*.

Základní komponenty	c [M] v zásobním roztoku	Množství na 1 litr média
$\text{K}_x\text{H}_y\text{PO}_4$ , pH 6,8	1	10 ml
DL-malát amonný, pH 6,8	1	10 ml
Koncentrovaný základ	tab. 6-6	10 ml



Tab. 6-5  
Pokračování.

Základní komponenty	c [M] v zásobním roztoku	Množství na 1 litr média
Kovy	tab. 6-7	0,5 ml
Kaseinový hydrolyzát	-	1 g

Tab. 6-6  
Složení koncentrovaného základu (pH 6,8) z tab. 6-5.

Složka	Množství na 1 litr
Kyselina nitrilotrioctová	10 g
MgSO <sub>4</sub>	14,45 g
CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	3,335 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> · 4 H <sub>2</sub> O	9,25 mg
FeSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	99 mg
Kyselina nikotinová	50 mg
Thiamin · HCl	25 mg
Biotin	0,5 mg

Tab. 6-7  
Složení zásobního roztoku kovů pro růstové médium z tab. 6-5.

Složka	1. zás. roztok na 100 ml	m [mg] na 1 litr
CuSO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O	980 mg	39,2
ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	2,2 g	1095
FeSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	-	500
MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	-	154
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	-	24,8
Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> · 10 H <sub>2</sub> O	-	4000
EDTA	-	250

## 6.2 Izolace membrán

Membrány, obsahující fotosyntetické komplexy, jsem připravoval ze všech bakteriálních kultur (kapitola 5.1). Během izolace jsem materiál chladil na ledu a nevystavoval jej světlu.

Buňky v růstovém médiu jsem stočil na centrifuze Eppendorf 5804 R (10 000 × g, 5 min, 5 °C) a promyl v pufru Tris-HCl (50 mM Tris, pH 7,5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>). Buněčnou suspenzi jsem nejprve homogenizoval pomocí Potterova homogenizátoru a poté čtyřikrát aplikoval do Frenchova lisu (12 000 psi), čímž došlo k rozbití buněk. Nerozbité buňky jsem odstranil centrifugací (10 000 × g, 5 min, 5 °C). Supernatant jsem poté recentrifugoval na centrifuze Sorvall RC (60 000 × g, 30 min, 5 °C) a získal tak membrány, které jsem resuspendoval v pufru Tris-HCl a analyzoval.

Pro dlouhodobé uskladnění jsem membrány zamrazil v tekutém dusíku a umístil v mrazicím boxu (−80 °C).

### 6.3 Izolace komplexů LH1-RC

Komplexy LH1-RC jsem izoloval z bakterií *Erythrobacter* sp. NAP1 a *Roseobacter* sp. COL2P dle protokolu, který vypracoval Mgr. Alexander Dulebo (Dulebo, osobní sdělení). Materiál jsem opět chladil na ledu a zbytečně jej nevystavoval světlu.

Nejprve jsem si připravil potřebné pufrы (složení viz tabulky 6-8, 6-9, 6-10 a 6-11), které jsem přefiltroval přes membránový filtr (póry 0,2 µm) a sterilizoval v autoklávu.

Tab. 6-8  
Složení pufru TE-NaCl (pH 7,5).

Složka	Zásobní roztok	c v pufru
Tris	1M	50 mM
MgCl <sub>2</sub>	1M	10 mM
CaCl <sub>2</sub>	1M	10 mM
NaCl	4M	50 mM
Glycerol	100%	20% (v/v)
EDTA	0,5M	1 mM
PMSF	-	1 mM

Tab. 6-9  
Složení promývacího pufru (pH 7,5).

Složka	Zásobní roztok	c v pufru
Tris	1M	50 mM
MgCl <sub>2</sub>	1M	10 mM
CaCl <sub>2</sub>	1M	10 mM
NaCl	4M	50 mM
LDAO	30%	0,05% (v/v)

Pozn.: LDAO byl přidán až po sterilizaci těsně před chromatografií.

Tab. 6-10  
Složení elučního pufru (pH 7,5).

Složka	Zásobní roztok	c v pufru
Tris	1M	50 mM
MgCl <sub>2</sub>	1M	10 mM
CaCl <sub>2</sub>	1M	10 mM
NaCl	4M	0,5 M
LDAO	30%	0,05% (v/v)

Pozn.: LDAO byl přidán až po sterilizaci těsně před chromatografií.

Tab. 6-11

Složení roztoku pro hustotní gradient sacharosy (pH 7,5).

Složka	Zásobní roztok	c v roztoku
Tris	1M	50 mM
MgCl <sub>2</sub>	1M	10 mM
CaCl <sub>2</sub>	1M	10 mM
NaCl	4M	50 mM
Sacharosa	-	0,5 M
LDAO	30%	0,05% (v/v)

Pozn.: LDAO byl přidán až po sterilizaci těsně před ultracentrifugací.

Připravené membrány jsem rozpustil v pufru TE-NaCl (složení viz tabulka 6-8). K suspenzi jsem za stálého jemného míchání ve tmě v lednici po kapkách přidal 30% roztok LDAO do finální 1% koncentrace. Solubilizace membrán pak probíhala 8 hodin. Nesolubilizované membrány jsem následně odstranil odstředěním na ultracentrifuze Beckman LE-80K ( $100\,000 \times g$ , 2 hod, 4 °C). Komplexy LH1-RC obsažené v supernatantu jsem poté purifikoval ionexovou chromatografií na Q/DEAE-Sepharosovém sloupci a ultracentrifugací v kontinuálním hustotním gradientu sacharosy (principy a provedení těchto purifikačních metod jsou uvedeny v kapitolách 6.4 a 6.5). Purifikované LH1-RC jsem nakonec zakoncentroval filtrační centrifugací (5krát:  $1500 \times g$ , 10 min, 4 °C) použitím promývacího pufru, čímž došlo k odstranění soli případně sacharosy a analyzoval.

Pro dlouhodobé uchování jsem komplexy LH1-RC zamrazil v tekutém dusíku a uskladnil v mrazicím boxu (−80 °C).

## 6.4 Ionexová chromatografie

### 6.4.1 Princip ionexové chromatografie

Chromatografické separační metody jsou založeny na interakci látek rozpuštěných v mobilní fázi s pórovitým materiálem ve sloupci, jenž představuje stacionární fázi. Různé látky na základě svých vlastností interagují se stacionární fází různým způsobem, takže rychlost jejich průniku je rozdílná.

Při ionexové chromatografii se zkoumaný polyelektrolyt váže na polární nosič. Dochází tak k reverzibilní výměně iontů mezi stacionární a mobilní fází. Tato výměna iontů je způsobena tzv. ionexy, které jsou tvořeny nabitými skupinami kovalentně

vázanými k nosiči. Rozlišujeme měniče aniontů (anexy) a kationtů (katexy). Rychlost průtoku, dostupnost iontů a stabilitu ionexů určují vlastnosti nosiče. Jako nosiče se používají zejména tři druhy materiálů: syntetické pryskyřice, celulósa a gely na bázi polyakrylamidu nebo polydextranů (Voet a Voet, 1995).

## **6.4.2 Provedení ionexové chromatografie**

Ionexová chromatografie probíhala ve tmě v lednici. Používal jsem celulosové nosiče Q-Sepharosu, tedy silný anex s kvarterní aminovou skupinou a DEAE-Sepharosu, jež představuje slabý anex s diethylaminoethylovou skupinou. Podmínky chromatografie byly v obou případech stejné.

Nejprve jsem nastavil rychlost průtoku kolonou promýváním destilovanou vodou na 0,5 ml za minutu a následně kolonu promyl promývacím pufrem (složení viz tabulka 6-9). Poté jsem aplikoval vzorek (solubilizované membrány) a opět kolonu promýval promývacím pufrem. Separace a eluce frakce LH1-RC je vyvolána změnou koncentrace NaCl v elučním pufru (složení viz tabulka 6-10). Ředěním elučního pufru jsem si připravil pětistupňový gradient (0,1M, 0,2M, 0,3M, 0,4M a 0,5M roztoky NaCl), který jsem postupně aplikoval na kolonu. Jednotlivé eluované frakce jsem identifikoval spektrofotometricky. Frakce LH1-RC (tmavě červená) se začala vymývat při použití roztoku s 0,3M koncentrací NaCl. Získanou frakci komplexů LH1-RC jsem následně zakoncentroval filtrační centrifugací (viz kapitola 6.3) a aplikoval na hustotní gradient sacharosy (viz kapitola 6.5).

Kolonu jsem přečistil 20 ml 2M roztoku NaCl, následně promyl destilovanou vodou a 20% roztokem ethanolu.

## **6.5 Ultracentrifugace v hustotním gradientu**

### **6.5.1 Princip ultracentrifugace v hustotním gradientu**

Tato separační metoda umožňuje dělení směsi látek na základě rozdílných sedimentačních koeficientů. K lepšímu rozdělení jednotlivých složek dochází použitím hustotních gradientů, jenž se připravují tak, že koncentrace nějaké inertní látky (nejčastěji sacharosy) se zvyšuje směrem ke dnu kyvety.

Směs makromolekul se poté opatrně navrství na takto připravený gradient. Jednotlivé zóny makromolekul putují vlivem odstředivé síly různou rychlostí. Tato rychlost závisí na velikosti a tvaru částic a také na síle odstředivého pole, hustotě a viskozitě prostředí. Jednotlivé zóny se zastaví, jakmile dojde k vyrovnání hustot těchto zón a okolního prostředí (Voet a Voet, 1995).

## **6.5.2 Provedení ultracentrifugace v hustotním gradientu**

Jako inertní materiál pro přípravu hustotního gradientu jsem používal sacharosu.

Postupoval jsem tak, že předem připravený roztok pro hustotní gradient (složení viz tabulka 6-11) jsem převedl do kyvet, které jsem poté umístil na dobu 3 hodin do mrazicího boxu ( $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Kontinuální hustotní gradient sacharosy se vytvořil postupným pomalým rozmrazováním v lednici.

Na takto připravený hustotní gradient jsem opatrně aplikoval vzorek zakonzentrovaných komplexů LH1-RC a následně jej centrifugoval na ultracentrifuze Beckman LE-80K ( $100\,000 \times g$ , 30 hod,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Účinnost purifikace LH1-RC (tmavě červená frakce) jsem určil spektrofotometricky. LH1-RC jsem ještě přečistil další ionexovou chromatografií tentokrát na DEAE-Sepharosovém sloupci (postup viz kapitola 6.4.2).

## **6.6 Spektrofotometrie v ultrafialové a viditelné oblasti**

### **6.6.1 Princip spektrofotometrie**

Touto metodou se sleduje absorpce záření při průchodu prostředím, hovoříme tedy o absorpční spektrofotometrii. Absorpční spektrum je závislost úbytku intenzity záření po průchodu vzorkem na energii záření.

Podstatou spektrofotometrie v oblasti UV-Vis jsou elektronové přechody, k nimž dochází po dopadu záření o vhodné energii na vzorek, tato energie je pohlcena a dojde k excitaci elektronů na vyšší energetickou hladinu (Anzenbacher a Kovář, 1986).

Spektrofotometrii používáme k charakterizaci látky pomocí absorpčních spekter nebo k výpočtu koncentrace látky v roztoku (dle Lambertova-Beerova zákona).

## **6.6.2 Stanovení absorpčního spektra**

Absorpční spektra jsem zaznamenal pomocí spektrofotometru Shimadzu UV-3000, který pracuje v dvoupaprskovém režimu (rozlišení 0,5 nm, spektrální šířka štěrbiny 2 nm). Absorpční spektra jsem měřil v rozsahu od 350 do 900 nm za laboratorní teploty.

Při určování absorpčních spekter membrán nebo komplexů LH1-RC jsem vzorky ředil příslušnými pufrů, jako slepý vzorek jsem použil příslušný pufr. Pro měření absorpčních spekter celých buněk jsem buňky resuspendoval v 75% roztoku glycerolu, jako slepý vzorek jsem použil 75% roztok glycerolu. Použitím glycerolu se totiž omezí rozptyl světla buňkami.

## **6.7 Polyakrylamidová gelová elektroforéza v prostředí SDS**

### **6.7.1 Princip SDS-PAGE**

Principem metody je dělení nabitých částic v elektrickém poli na základě různých elektroforetických pohyblivostí.

Polyakrylamidový gel připravíme polymerací N,N'-methylenbisakrylamidu (síťovací činidlo) a akrylamidu. Velikost pórů je ovlivněna koncentrací obou složek a jejich vzájemným poměrem. Iniciátorem a stabilizátorem reakce je peroxodisíran amonný (APS), respektive N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin (TEMED).

Tenzid dodecylsulfát sodný (SDS) se svým uhlovodíkovým řetězcem váže na hydrofobní část polypeptidů, čímž je denaturuje a mění jejich tvar do válcovité podoby. Velký záporný náboj SDS překrývá vlastní náboj polypeptidů, které se pak pohybují v elektrickém poli směrem k anodě. SDS také poruší nekovalentní vazby mezi podjednotkami polypeptidových řetězců a 2-merkaptóethanol redukuje jejich disulfidové vazby, pak je možné stanovit relativní molekulovou hmotnost jednotlivých podjednotek.

Vzorky se nanášejí do startovního velkopórového gelu, kde dochází k zaostření jednotlivých zón polypeptidů. Na něj navazuje dělicí malopórový gel, v němž probíhá vlastní proces dělení.

Elektroforéza se používá k preparacím či charakterizaci látek, např. ke stanovení čistoty preparátů nebo relativní molekulové hmotnosti (Voet a Voet, 1995).

## 6.7.2 Provedení SDS-PAGE

Pro detekci proteinového složení jsem používal modifikovaný Laemmliho postup (Laemmli, 1970). Nejprve jsem si připravil potřebné zásobní roztoky (složení uvedeno v tab. 6-12), přičemž zásobní roztok APS jsem připravoval vždy čerstvý a elektrodový pufr jsem před použitím pětkrát řdil.

Tab. 6-12  
Složení zásobních roztoků pro SDS-PAGE.

Zásobní roztok	Složení	pH
1,5M Tris	9,08 g Tris v 50 ml dest. vody	8,8
1M Tris	6,06 g Tris v 50 ml dest. vody	6,8
30% akrylamid	29,2 g akrylamidu; 0,8 g Bis ve 100 ml dest. vody	-
10% SDS	1 g SDS v 10 ml dest. vody	-
10% APS	0,1 g APS v 1 ml dest. vody	-
Elektrodový pufr	15 g Tris; 72 g glycinu; 5 g SDS v 1000 ml dest. vody	8,3

Používal jsem 15% dělicí a 4% startovní polyakrylamidový gel (složení uvedena v tab. 6-13 a 6-14).

Tab. 6-13  
Složení roztoku pro přípravu 15% dělicího polyakrylamidového gelu.

Složka	Zásobní roztok	V [ml]
Destilovaná voda	-	2,3
Tris	1,5M, pH 8,8	2,5
Akrylamid	30%	5
SDS	10%	0,1
APS	10%	0,1
TEMED	-	0,004

Tab. 6-14  
Složení roztoku pro přípravu 4% startovního polyakrylamidového gelu.

Složka	Zásobní roztok	V [ml]
Destilovaná voda	-	2,1
Tris	1M, pH 6,8	0,38
Akrylamid	30%	0,5
SDS	10%	0,03
APS	10%	0,03
TEMED	-	0,003

Elektroforézu jsem prováděl na aparatuře Biometra Whatman Minigel-Twin v chladové místnosti při teplotě 4–7 °C. Elektroforéza probíhala vždy za konstantního napětí 180 V po dobu 1,5 hodiny.

Proteiny jsem detekoval barvením gelů v 0,25% roztoku Coomassie Brilliant Blue R250 v odbarvovacím roztoku (ethanol : voda : kyselina octová = 5 : 5 : 1) přes noc. Odbarvování pozadí probíhalo po dobu tří dnů v odbarvovacím roztoku, přičemž jsem roztok třikrát vyměnil.

Pro určení relativní molekulové hmotnosti proteinů jsem používal sadu standardů Sigma-Aldrich (katalogové číslo M-3788, rozsah Mr 36 000–205 000 Da) a polylysozym (Mr monomeru 14 300 Da).

Vzorky pro SDS-PAGE jsem připravil podle následujícího postupu. Suspenzi buněk, membrán a komplexů LH1-RC v příslušných pufrech jsem smísil se solubilizačním pufrem (složení uvedeno v tabulce 6-15) v poměru 1 : 1. Směs jsem dobře promíchal a následně nechal inkubovat na třepačce (Amplituda = 3, 150 min<sup>-1</sup>, 30 min, 37 °C). Takto připravené vzorky jsem posléze pomocí mikrostříkačky nanesl do jamek v gelu.

Tab. 6-15  
Složení solubilizačního pufru.

Složka	Zásobní roztok	Množství v pufru
Tris	0,125M, pH 6,8	14,8 ml
Glycerol	-	3,17 ml
2-merkaptoethanol	-	2 g
SDS	-	0,8 g
Bromfenolová modř	-	1,5 mg

## 6.8 Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)

### 6.8.1 Princip HPLC

Vysokoučinná kapalinová chromatografie se používá k dělení směsi látek, jedná se v podstatě o zdokonalenou sloupcovou chromatografii. Mobilní fáze při ní neprotéká kolonou pouze působením gravitační síly, ale její průchod je urychlen použitím vysokého tlaku (až 70 MPa). Vysoký tlak nejen urychluje celý proces, ale umožňuje i použití nosičů složených z menších částic (větší interakční povrch), čímž dochází k lepšímu rozdělení směsi.



Nejpoužívanější je HPLC s reverzní fází (s nepolární stacionární a polární mobilní fází), přičemž nepolární částice, interagující se stacionární fází, procházejí kolonou pomaleji než částice polární, které interagují s fází mobilní a vytékají z kolony dříve.

Detekce se uskutečňuje pomocí UV-Vis detektoru v oblasti vlnových délek 250–1000 nm. Jednotlivé složky dělené směsi, vytékající z kolony, charakterizuje jejich retenční čas. Dané látky identifikujeme porovnáním s retenčními časy známých látek, přičemž analýzy musí probíhat za stejných podmínek.

HPLC může být propojeno s hmotnostním spektrometrem. Porovnáním hmotnostních spekter daných látek s hmotnostními spektry známých látek lze určit jednotlivé složky dělené směsi i bez znalosti jejich retenčních časů (Voet a Voet, 1995).

## 6.8.2 Extrakce pigmentů

Pigmenty jsem extrahoval do směsi aceton : methanol v poměru 7 : 2 (pro HPLC karotenoidového složení kmene NAP1 byla extrakce provedena do methanolu).

Extrakci jsem provedl tak, že jsem odebral 100 µl vzorku (suspenze buněk, membrán nebo komplexů LH1-RC), přidal 1 ml rozpouštědla a nechal 5 minut důkladně promíchat na vortexu ve tmě. Vysrážené proteiny jsem odstranil centrifugací na centrifuze Eppendorf Mini spin plus (10 000 × g, 5 min, laboratorní teplota) a supernatant (extrakt) dále analyzoval.

Extrakt jsem jednak analyzoval pomocí HPLC (viz kapitola 6.8.3) a jednak spektrofotometricky.

Spektrofotometricky jsem měřením při 770 nm a výpočtem dle rovnice (1) ( $\epsilon_{770} = 76 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) určil množství BChl *a* a měřením při 482 nm a výpočtem dle rovnice (2) ( $\epsilon_{482} = 123,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) určil množství sferoidenonu. Jejich vzájemný poměr pak udává pigmentovou stechiometrii světlosběrného systému.

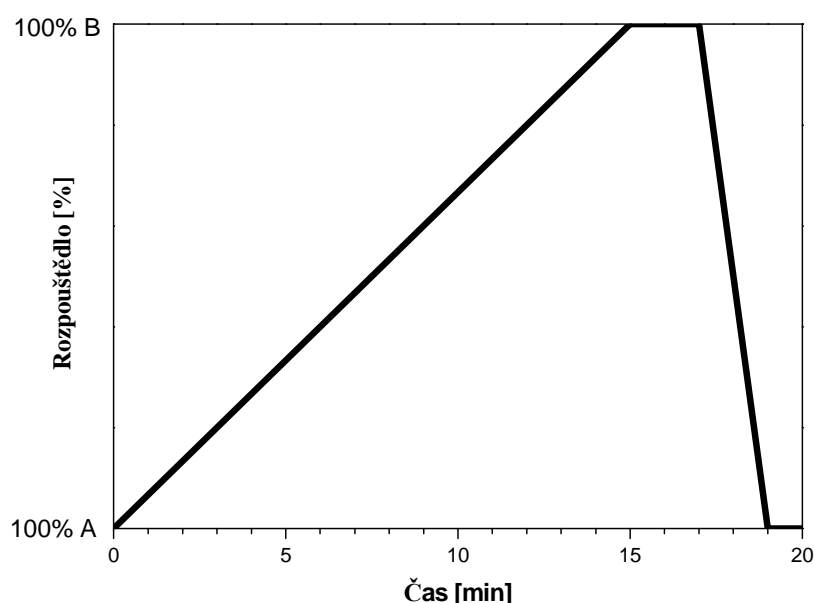
$$c_{BChl} = \left[ A_{770} \cdot 14430 \cdot \left( \frac{V_{extrakt}}{V_{suspenze}} \right) \right] nM \quad (1)$$

$$c_{sferoidenon} = \left[ A_{482} \cdot 8091 \cdot \left( \frac{V_{extrakt}}{V_{suspenze}} \right) \right] nM \quad (2)$$

### 6.8.3 Provedení HPLC

Extrakty jsem analyzoval pomocí HPLC na přístroji Agilent 1200 Series system (Agilent Technologies Inc., Palo Alto, CA, USA). Přístroj je vybaven UV-Vis diode-array detektorem (Agilent DAD 61315B). Pigmenty byly separovány při 35 °C na koloně Phenomenex Luna 3 $\mu$  C8(2) 100 Å. Separace probíhala binárním systémem rozpouštědel (A: 80 % methanol, 20 % 28mM octan amonný; B: 100 % methanol), jehož průběh je znázorněn na obrázku 6-1.

Jednotlivé pigmenty jsem identifikoval na základě *online* absorpčních spekter a retenčních časů srovnáním s autentickými standardy.



Obr. 6-1

Diagram průběhu HPLC s binárním systémem rozpouštědel. Vysvětlivky: A – rozpouštědlo A (80 % methanol, 20 % 28mM octan amonný), B – rozpouštědlo B (100 % methanol).

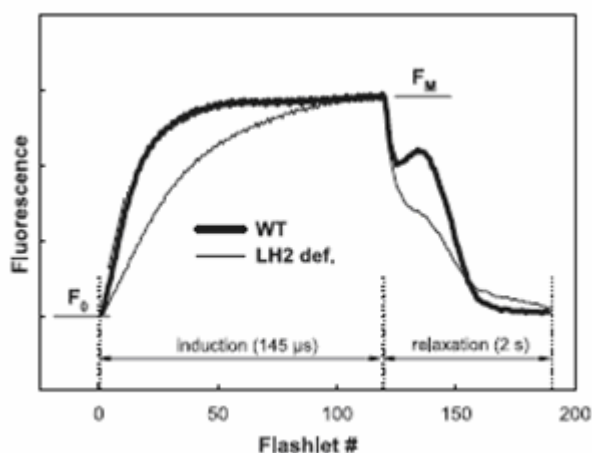
## 6.9 Kinetická fluorimetrie

### 6.9.1 Princip kinetické fluorimetrie

Kinetická fluorimetrie slouží k monitorování zastoupení a fyziologie mořského fytoplanktonu. Doposud používané fluorimetrické přístroje byly schopny pracovat s převážně předem laboratorně zakoncentrovanými vzorky, čímž vyvstal problém s měřením velmi zředěných vzorků fytoplanktonu (Koblížek *et al.*, 2005a).

Z tohoto důvodu byl vyvinut nový citlivý kinetický fluorimetr, který může měřit i velmi zředěné vzorky. Jedná se o modifikovaný dvoumodulovaný fluorimetr, přičemž přístroj umožňuje definovat časování jednotlivých událostí (záblesk, měření) (Trtílek *et al.*, 1997; Dijkman *et al.*, 1999). Díky modifikaci je přístroj schopen simultánně měřit fluorescenční kinetiku Chl *a* (fytoplankton) i BChl *a* (AAP) (Koblížek *et al.*, 2005a).

Kinetickou fluorimetrií je možné měřit fotochemickou aktivitu fotosyntetických komplexů. Pomocí fluorescenčních parametrů  $F_0$ ,  $F_M$  a  $F_V$  ( $F_M - F_0$ ) se sleduje tzv. indukce fluorescence. Tato indukce odpovídá přenosu elektronů ve fotosyntetických kom-



plexech po ozáření, přičemž indukční křivka (viz obrázek 6-2) vyjadřuje oxidovaný ( $F_0$ ) a redukovaný ( $F_M$ ) stav primárního elektronového akceptoru (ubichinon) (Dijkman *et al.*, 1999). Poměr  $F_V / F_M$  poté udává kvantový výtěžek primární separace nábojů, tedy i jakousi světlosběrnou účinnost fotosyntetického komplexu (Koblížek *et al.*, 2005b).

Obr. 6-2

Indukční a relaxační fluorescenční křivky pro přirozenou (tučná čára) a mutantní, LH2 postrádající (slabá čára), AnAP *Rhodospirillum rubrum*. Zkratky:  $F_0$  – minimální fluorescence,  $F_M$  – maximální fluorescence, WT – wild-type. (upraveno dle Koblížek *et al.*, 2005b)

## 6.9.2 Měření fotochemické aktivity

K měření fotochemické aktivity a teplotní stability komplexu LH1-RC z *Erb. sp.* NAP1 jsem použil dvoumodulovaný fluorimetr FL-100 vybavený termoregulátorem TR 2000 (PSI Ltd., Brno, Česká republika). Zdrojem záření byly modré LED diody (450 nm). Signál byl detekován pomocí PIN photodiode detektoru chráněného infračerveným filtrem (LP 850 nm, Oriel 51352, USA).

Vzorek (6,9 µl LH1-RC + 2,3 ml promývacího pufru s 0,05% LDAO, pH=7,5) jsem aplikoval ve skleněné kyvetě do vzorkové dutiny a osvětlil (140 µs). Tento proces jsem poté opakoval v závislosti na teplotě (11,4–45,9 °C) po přibližně 5 °C. Parametry fluorescence  $F_0$  a  $F_M$  byly zaznamenány na začátku (0,5 ms) a konci (~300 ms) rychlé indukční kinetiky.

## 7 Výsledky

### 7.1 Purifikace komplexů LH1-RC

Komplexy LH1-RC jsem izoloval a purifikoval ze dvou AAP kmenů, *Erythrobacter* sp. NAP1 a *Roseobacter* sp. COL2P.



Pigmentoproteinové komplexy z *Erb.* sp. NAP1 jsem purifikoval nejprve ionexovou chromatografií na koloně s Q-Sepharosou, získanou frakci komplexů LH1-RC jsem poté aplikoval na hustotní gradient sacharosu. Po ultracentrifugaci se vytvořila tmavě červená zóna LH1-RC komplexů (viz obrázek 7-1), kterou jsem přečistil další ionexovou chromatografií, tentokrát na DEAE-Sepharosové koloně.

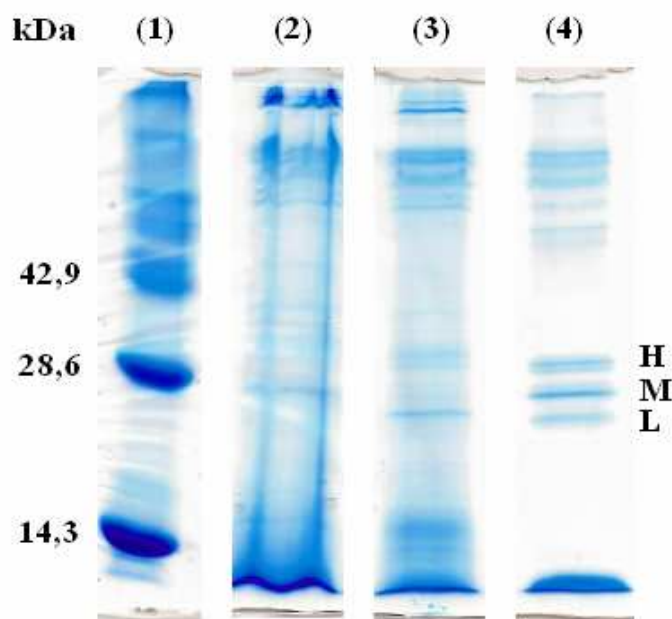
Vzhledem k malému počátečnímu množství bakteriální kultury *Rsb.* sp. COL2P jsem její pigmentoproteinové komplexy purifikoval pouze ionexovou chromatografií na koloně s DEAE-Sepharosou.

Obr. 7-1

Kontinuální hustotní gradient sacharosu s vyznačenou tmavě červenou zónou komplexů LH1-RC bakterie *Erb.* sp. NAP1. Oranžová frakce představuje volné karotenoidy.

Úspěšnost izolačního a purifikačního postupu dokumentuje nárůst koncentrace BChl *a* v extraktech (buňky < membrány < LH1-RC). Koncentrace BChl *a* jsem vypočítal z ploch vrcholů získaných HPLC pigmentových extraktů z kmene NAP1 (chromatogramy zaznamenány při 770 nm). Koncentrační poměr BChl *a* (nmol·l<sup>-1</sup>) buňky : membrány je přibližně 1 : 1,5 a poměr BChl *a* buňky : LH1-RC ~ 1 : 4,9.

Během izolace jsem sledoval proteinové složení pomocí SDS-PAGE. Na obrázku 7-2 na následující straně je vidět proteinové zastoupení v buňkách, membránách a LH1-RC. Zároveň můžeme pozorovat trend snižování zastoupení jednotlivých proteinů během izolace, ve dráze (4) jsou již patrné tři podjednotky RC. Identifikaci jednotlivých proteinů a určení jejich relativních molekulových hmotností je věnována kapitola 7.3.



Obr. 7-2

SDS-PAGE preparátů z bakterie *Erb. sp. NAP1*. Dráhy: (1) proteinový standard, (2) buňky, (3) membrány, (4) purifikovaný LH1-RC s vyznačenými podjednotkami RC (H, M a L).

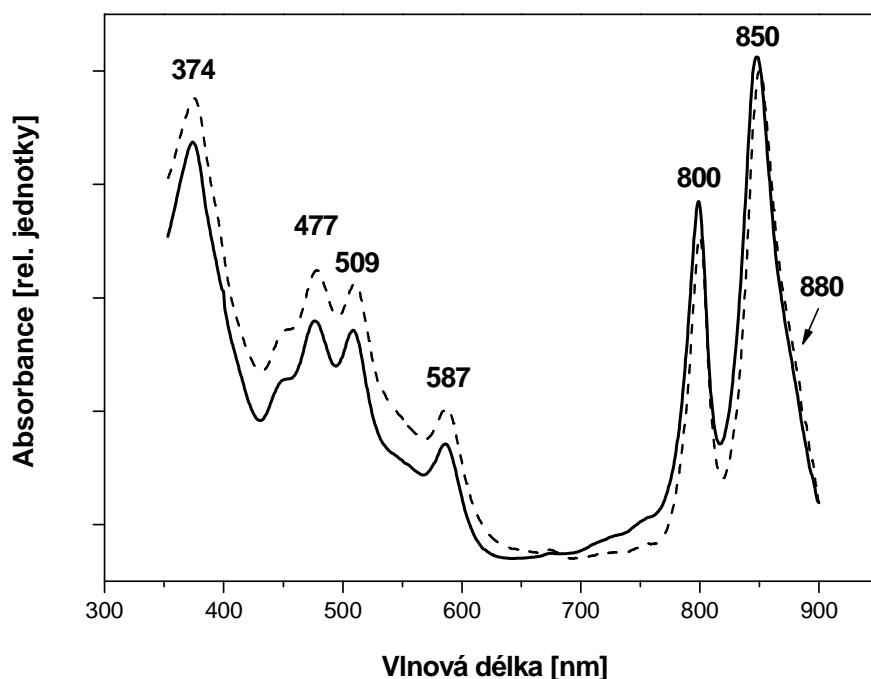
Čistotu preparátu LH1-RC jsem ověřil poměrem  $A_{276}/A_{867}$ , kde  $A_{276}$  odpovídá absorpci aromatických aminokyselin, jež představují koncentraci proteinů a  $A_{867}$  odpovídá absorpci BChl *a* (viz obrázek 7-8 na straně 65). Pro LH1-RC z *Erythrobacter sp. NAP1* je poměr  $A_{276}/A_{867} = 0,48$ , což je v dobré shodě s  $A_{276}/A_{880} = 0,44$  pro vysoce purifikovaný komplex LH1-RC z purpurové bakterie *Rhodobium marinum* (Qian *et al.*, 2000).

## 7.2 Spektrální analýza fotosyntetického aparátu

Jak jsem již uvedl dříve, nejbližšími příbuznými AAP jsou purpurové fototrofní bakterie, jejichž nejstudovanějším zástupcem je bakterie *Rhodobacter sphaeroides*. Jedním z cílů této práce je porovnat AAP právě s *Rba. sphaeroides*, proto se nejprve budu věnovat spektrální charakteristice fotosyntetického aparátu této typické AnAP.

Na obrázku 7-3 na následující straně jsou uvedena absorpční spektra buněk (přerušovaná čára) a membrán (plná čára) z bakterie *Rba. sphaeroides*. BChl *a* charakterizuje několik absorpčních maxim, UV-A Soretův vrchol ( $B_Y$ ) při 374 nm, vrchol  $Q_X$  při 587 nm, infračervené ( $Q_Y$ ) absorpční vrcholy při 800 a 850 nm odpovídající LH2 anténě a raménko v oblasti 880 nm, jež představuje anténu LH1. Absorpční maxima

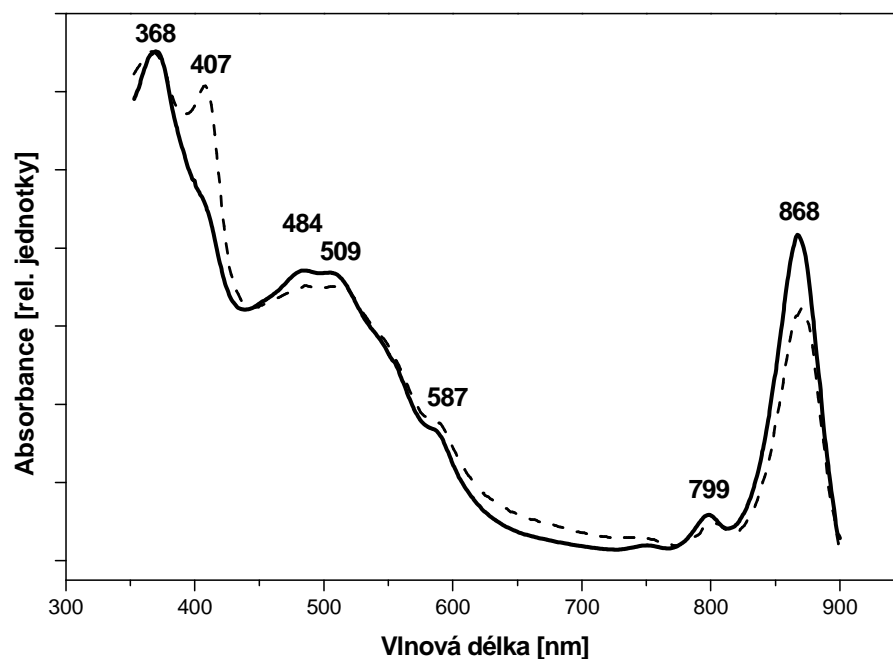
BChl *a* odpovídající reakčnímu centru jsou překryta anténami LH2 a LH1. Karotenoidy jsou odpovědné za absorpci v oblasti mezi 430 a 570 nm (vrcholy při 477 a 509 nm).



Obr. 7-3

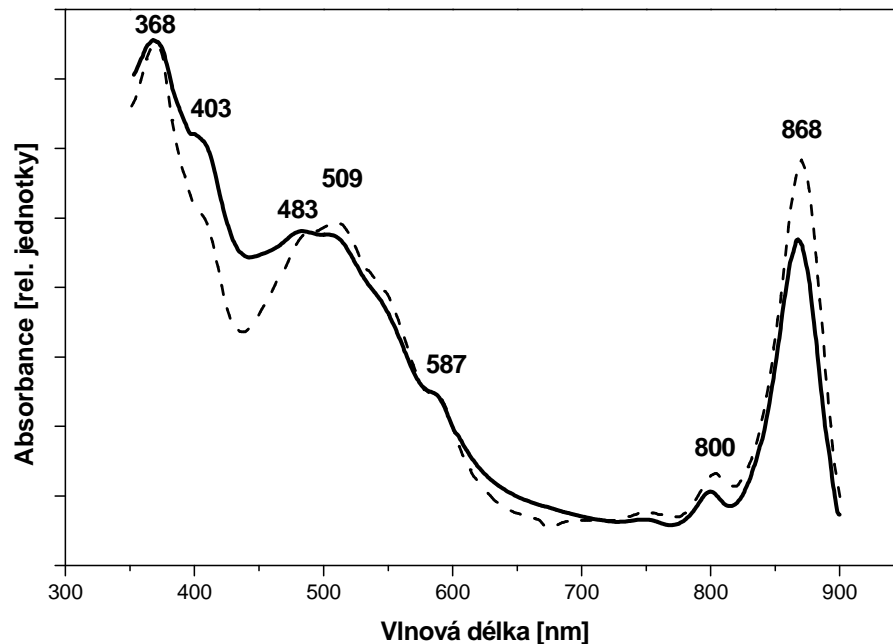
Absorpční spektra membrán (plná čára) a buněk (přerušovaná čára) z *Rba. sphaeroides* s vyznačenými absorpčními vrcholy BChl *a* (374, 587, 800, 850 a 880 nm) a karotenoidů (477 a 509 nm).

Absorpční spektra kmenů Dor-vul, Dor-2m a Zun-kholbo (viz obrázky 7-4, 7-5 na straně 63 a 7-6 na straně 64) jsou charakteristická absorpčními maximy BChl *a*: UV-A (Soretovy) vrcholy při 368 nm, vrcholy Q<sub>X</sub> při 587 nm, infračervená maxima (Q<sub>Y</sub>) v rozmezí od 867 do 868 nm odpovídající LH1 anténě a malé vrcholy mezi 799 a 800 nm ukazující na přítomnost RC. Anténa LH2 chybí. Karotenoidům odpovídá absorpce v oblasti od 430 do 570 nm. Raménka na Soretových absorpčních vrcholech v rozmezí 403 a 409 nm odpovídají cytochromům *c*.



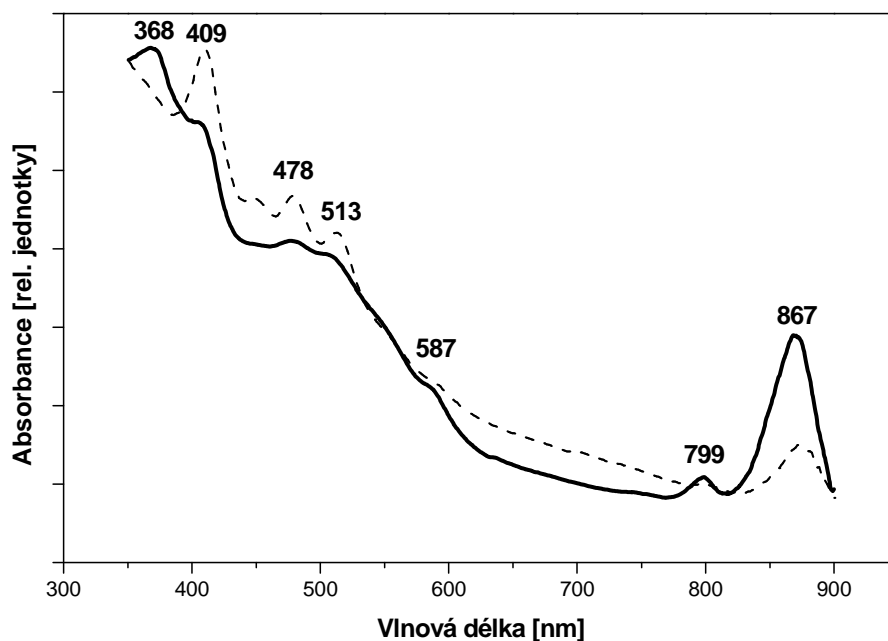
Obr. 7-4

Absorpční spektra membrán (plná čára) a buněk (přerušovaná čára) z kmene Dor-vul s vyznačenými absorpčními vrcholy BChl *a* (368, 587, 799 a 868 nm), karotenoidů (484 a 509 nm) a cytochromu (407 nm).



Obr. 7-5

Absorpční spektra membrán (plná čára) a buněk (přerušovaná čára) z kmene Dor-2m s vyznačenými absorpčními vrcholy BChl *a* (368, 587, 800 a 868 nm), karotenoidů (483 a 509 nm) a cytochromu (403 nm).



Obr. 7-6

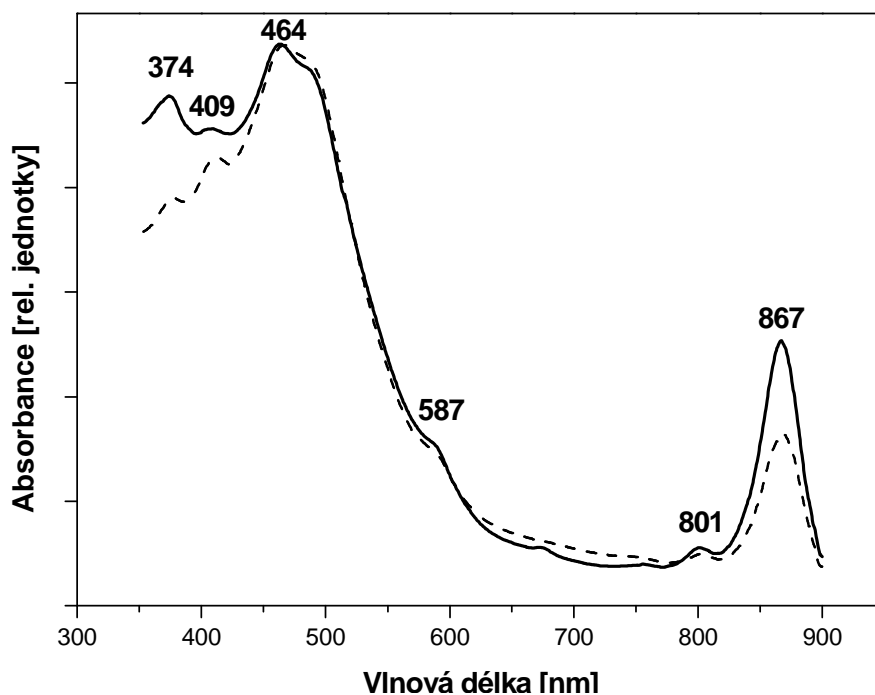
Absorpční spektra membrán (plná čára) a buněk (přerušovaná čára) z kmene Zun-kholbo s vyznačenými absorpčními vrcholy BChl *a* (368, 587, 799 a 867 nm), karotenoidů (478 a 513 nm) a cytochromu (409 nm).

Obrázky 7-7 a 7-8 na následující straně charakterizují fotosyntetický aparát AAP *Erythrobacter* sp. NAP1.

Na obrázku 7-7 jsou uvedena absorpční spektra buněk (přerušovaná čára) a membrán (plná čára) z bakterie *Erb.* sp. NAP1. Absorpci BChl *a* dokumentuje UV-A (Soretův) vrchol při 374 nm, vrchol  $Q_X$  při 587 nm, malý vrchol při 801 nm odpovídající RC a vrchol  $Q_Y$  při 867 nm, jenž představuje anténu LH1. Anténa LH2 není přítomna. Karotenoidy odpovídají za absorpci v oblasti od 430 do 570 nm. Malý vrchol při 409 nm ukazuje na přítomnost cytochromu *c*.

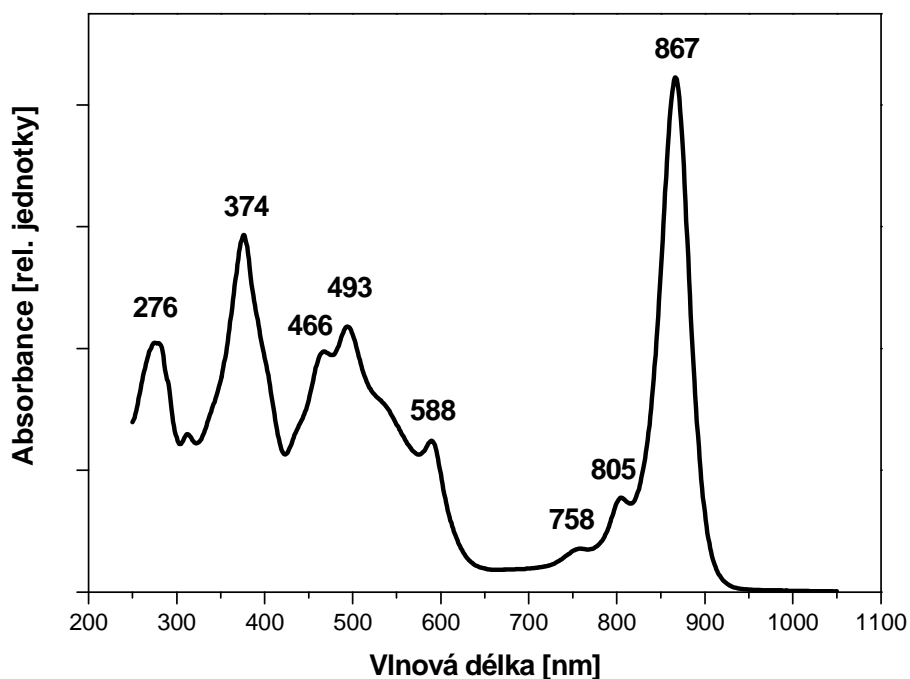
Absorpční spektrum purifikovaného komplexu LH1-RC z bakterie *Erb.* sp. NAP1 je uvedeno na obrázku 7-8. Na tomto absorpčním spektru je BChl *a* zobrazen dvěma hlavními vrcholy, Soretovým vrcholem při 374 nm a infračerveným vrcholem ( $Q_Y$ ) antény LH1 při 867 nm. Absorpci BChl *a* také charakterizuje vrchol  $Q_X$  při 588 nm. Přítomnost reakčního centra dokumentuje absorpční vrchol při 805 nm (BChl *a*) a při 758 nm (BPhe *a*). V oblasti od 430 do 570 nm absorbují karotenoidy (vrcholy při 466 a 493 nm). Malý vrchol či raménko v oblasti kolem 409 nm, jež by odpovídalo cytochromu *c*, není přítomno. Absorpční pás při 276 nm představuje absorpci aromatických aminokyselin a vypovídá tak o koncentraci proteinů.





Obr. 7-7

Absorpční spektrum membrán (plná čára) a buněk (přerušovaná čára) z bakterie *Erb. sp. NAP1* s vyznačenými absorpčními vrcholy BChl *a* (374, 587, 801 a 867 nm), karotenoidů (464 nm) a cytochromu (409 nm).

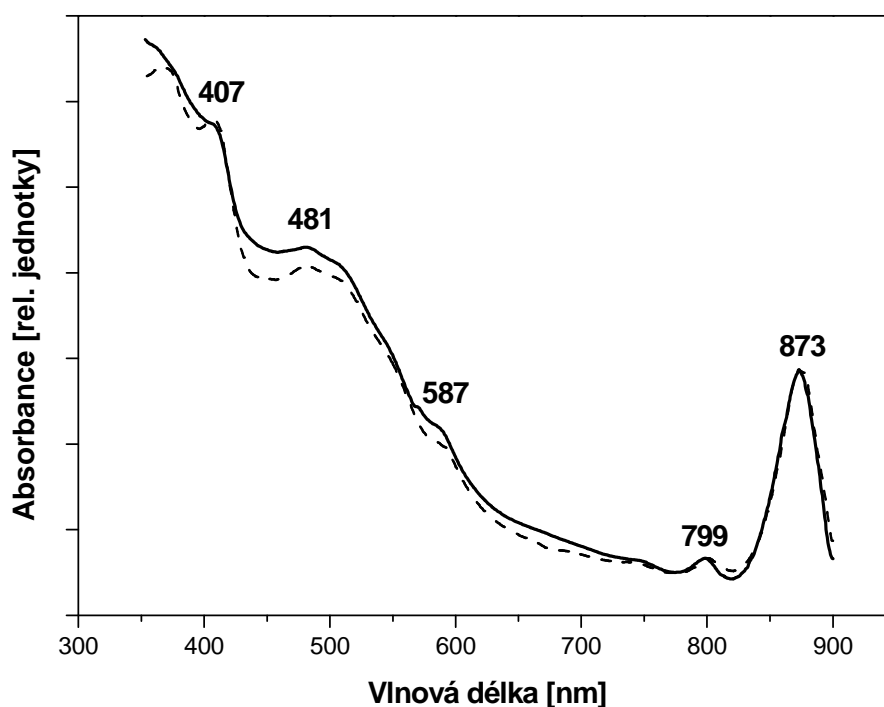


Obr. 7-8

Absorpční spektrum komplexu LH1-RC z *Erb. sp. NAP1* s vyznačenými absorpčními vrcholy BChl *a* (374, 588, 805 a 867 nm), BPhe *a* (758 nm), karotenoidů (466 a 493 nm) a AMK (276 nm).

Na následujících stranách uvedené obrázky 7-9 a 7-10 ukazují absorpční spektra preparátů z bakterie *Roseobacter sp. COL2P*.

Na obrázku 7-9 jsou uvedena absorpční spektra membrán (přerušovaná čára) a buněk (plná čára) z bakterie *Rsb. sp. COL2P*. Absorpční maximum při 873 nm přísluší  $Q_Y$  BChl *a*, který je vázán anténou LH1. Anténa LH2 opět není přítomna. Přítomnost reakčního centra dokazuje absorpční vrchol BChl *a* při 799 nm. Absorpce v oblasti 430 až 570 nm odpovídá karotenoidům (vrchol 481 nm). Raménko v oblasti okolo 587 nm představuje  $Q_X$  BChl *a*. Raménko okolo 407 nm poukazuje na přítomnost cytochromu *c*.



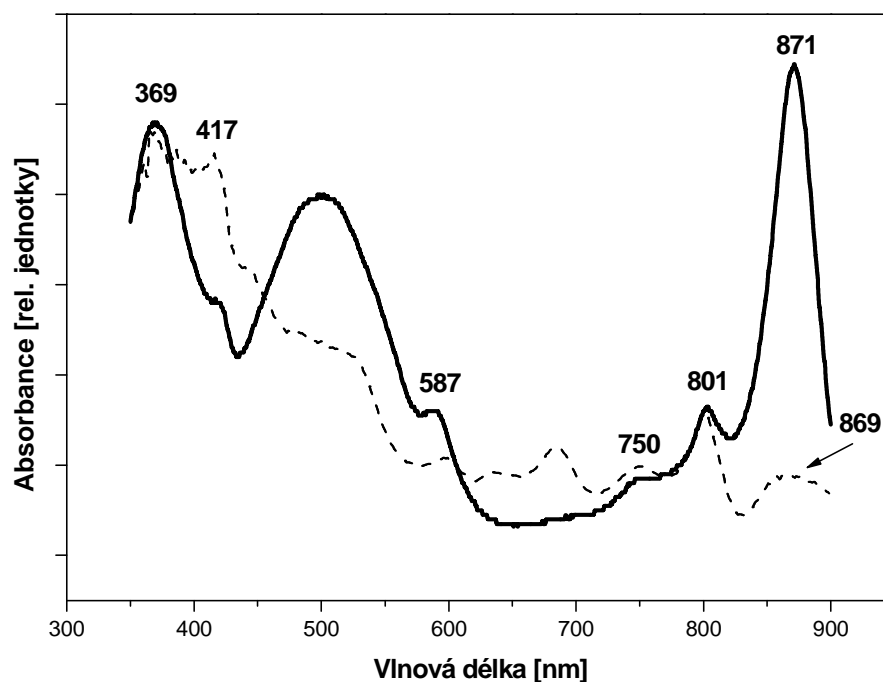
Obr. 7-9

Absorpční spektra membrán (plná čára) a buněk (přerušovaná čára) z bakterie *Rsb. sp. COL2P* s vyznačenými vrcholy BChl *a* (587, 799 a 873 nm), karotenoidů (481 nm) a cyt (407 nm).

Obrázek 7-10 na následující straně zobrazuje průběh purifikace LH1-RC z bakterie *Rsb. sp. COL2P*.

Plná čára představuje absorpční křivku frakce LH1-RC odebrané ihned po ionexové chromatografii na DEAE-Sepharové koloně. BChl *a* odpovídá Soretově vrcholu při 369 nm, vrcholu  $Q_X$  při 587 nm, vrcholu  $Q_Y$  antény LH1 při 871 nm a vrcholu RC při 801 nm. Karotenoidy jsou odpovědné za absorpci v oblasti 430 až 570 nm. Raménko okolo 417 nm ukazuje na přítomnost cytochromu *c*.

Přerušovaná čára znázorňuje absorpční křivku stejné frakce po zakoncentrování a promytí promývacím pufrem. Zde je vidět, že se komplex LH1-RC již rozpadl, patrně jsou tři vrcholy jakéhosi pozůstatku reakčního centra: BChl *a* odpovídají vrcholům při 801 a 869 nm, BPhe *a* odpovídá vrcholu při 750 nm. LH1 zcela chybí.



Obr. 7-10

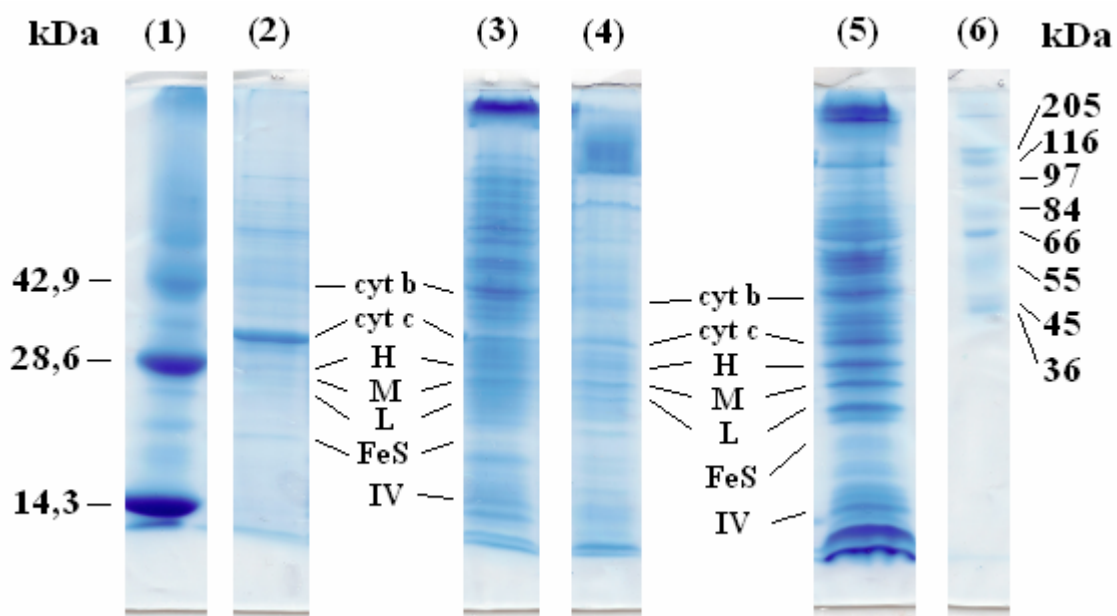
Absorpční spektra frakcí LH1-RC *Rsb. sp. COL2P* před (plná čára) a po (přerušovaná čára) zakoncentrování filtrační centrifugací s vyznačenými vrcholy BChl *a* (369, 587, 801, 869 a 871 nm), BPhe *a* (750 nm) a cytochromu (417 nm).

## 7.3 Proteinové složení

### 7.3.1 Proteinové složení membrán

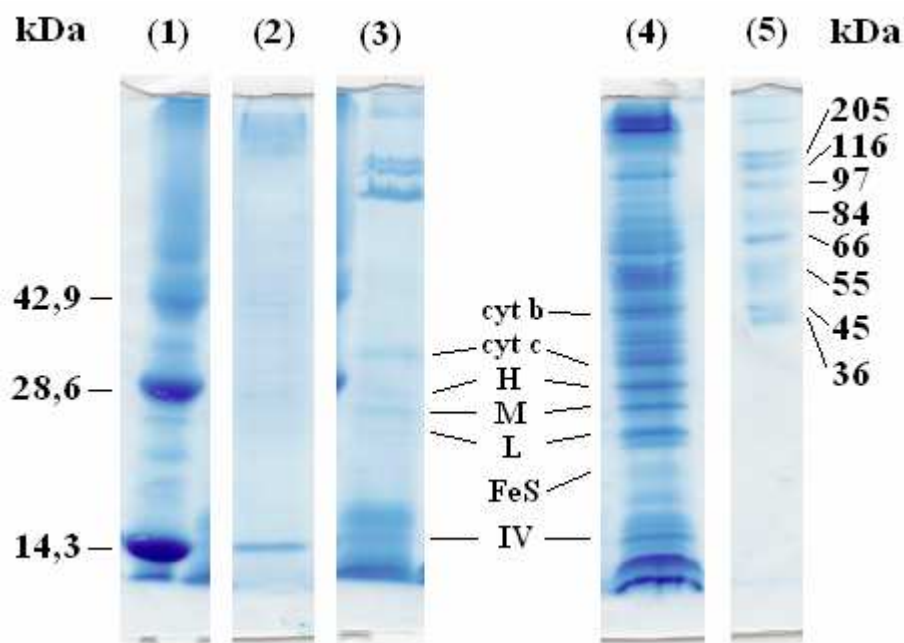
Proteinové složení membrán jednotlivých kmenů AAP jsem stanovil pomocí SDS-PAGE, ke srovnání jsem použil stejným způsobem připravené membrány z AnAP *Rhodobacter sphaeroides*.

Na obrázcích 7-11 a 7-12 na následující straně jsou uvedeny výřezy z SDS-PAGE membrán z kmenů Zun-kholbo, Dor-2m, Dor-vul, COL2P, NAP1 a pro srovnání bakterie *Rba. sphaeroides*. Jednotlivé proteiny přítomné v membránách bakterie *Rba. sphaeroides* jsem identifikoval na základě porovnání s SDS-PAGE purifikovaných membrán stejného bakteriálního druhu (Jungas *et al.*, 1999). V membránách *Rba. sphaeroides* jsou přítomny tři podjednotky RC (H ~ 32 kDa, M ~ 28 kDa, L ~ 25 kDa) a čtyři podjednotky komplexu cytochromu *bc*<sub>1</sub> (cyt *b* ~ 43 kDa, cyt *c*<sub>1</sub> ~ 36 kDa, Rieskeho FeS protein ~ 20 kDa, podjednotka IV ~ 14 kDa). Membrány jednotlivých AAP vždy obsahují tři podjednotky RC, podjednotkové složení komplexu cyt *bc*<sub>1</sub> se však může lišit (viz obr. 7-11 a 7-12).



Obr. 7-11

Výřezy z SDS-PAGE membrán. Dráhy: (1) proteinový standard, (2) Zun-kholbo, (3) Dor-2m, (4) Dor-vul, (5) *Rba. sphaeroides*, (6) proteinový standard. RC indukují tři polypeptidové podjednotky H, M a L. Cyt  $bc_1$  je znázorněn čtyřmi podjednotkami cyt *b*, cyt *c*, FeS a IV.



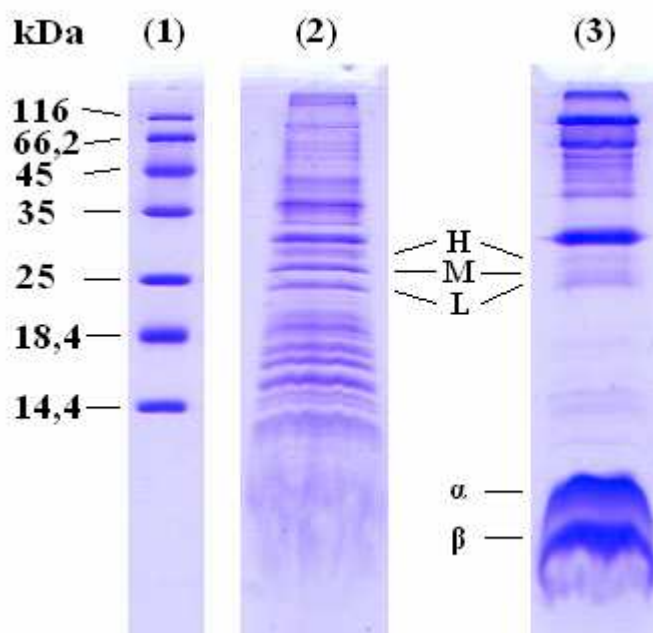
Obr. 7-12

Výřezy z SDS-PAGE membrán. Dráhy: (1) proteinový standard, (2) *Rsb. sp. COL2P*, (3) *Erb. sp. NAP1*, (4) *Rba. sphaeroides*, (5) proteinový standard. RC indukují tři polypeptidové podjednotky H, M a L. Cyt  $bc_1$  je znázorněn čtyřmi podjednotkami cyt *b*, cyt *c*, FeS a IV.

### 7.3.2 Proteinové složení frakcí LH1-RC

Přítomnost proteinů reakčního centra a světlosběrného komplexu ve frakcích LH1-RC izolovaných z bakterií *Roseobacter* sp. COL2P a *Erythrobacter* sp. NAP1 jsem určil pomocí SDS-PAGE.

Na obrázku 7-13 jsou uvedeny výřezy z SDS-PAGE frakcí LH1-RC z *Rsb.* sp. COL2P (dráha 2) a *Erb.* sp. NAP1 (dráha 3). RC, charakterizované třemi podjednotkami H, M a L, je přítomno u obou vzorků. Hodnoty relativních molekulových hmotností jednotlivých podjednotek odpovídají H = 29,3 kDa, M = 27,1 kDa a L = 25 kDa pro *Rsb.* sp. COL2P a H = 28,6 kDa, M = 27,1 kDa a L = 25,7 kDa pro *Erb.* sp. NAP1. Přítomnost antény LH1, indikované polypeptidy  $\alpha$  a  $\beta$ , jsem prokázal pouze u *Erb.* sp. NAP1. Relativní molekulová hmotnost polypeptidu  $\alpha$  je 9,5 kDa a polypeptidu  $\beta$  7,3 kDa.



Obr. 7-13

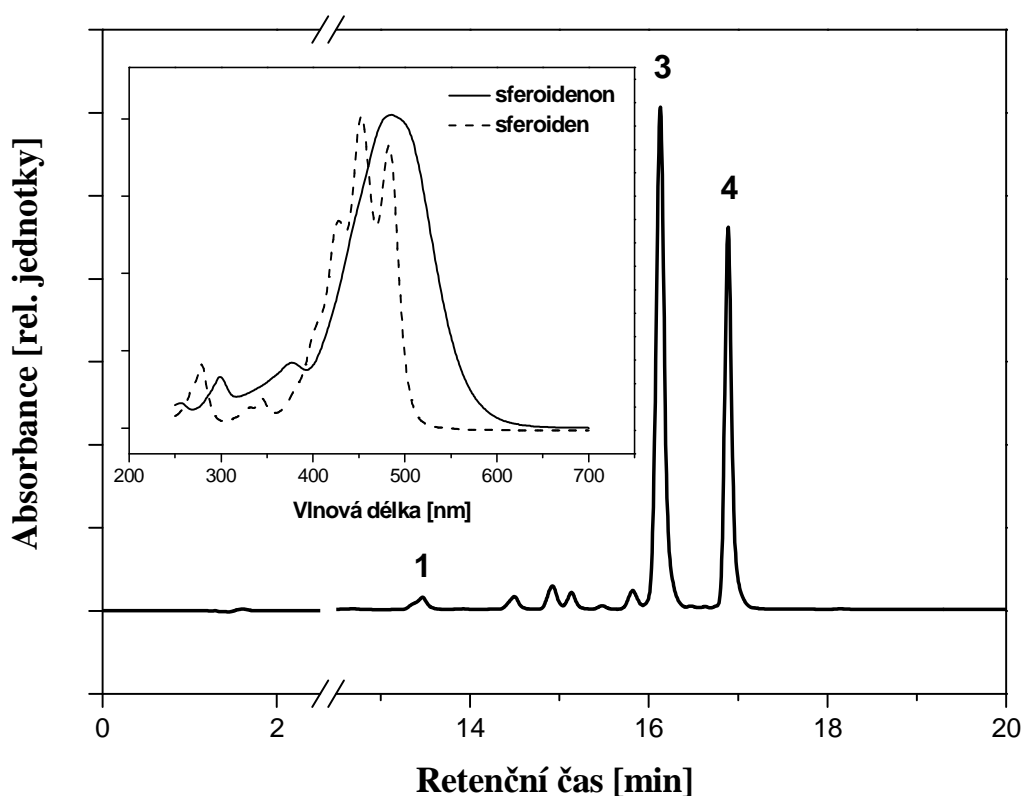
Výřezy z SDS-PAGE frakcí LH1-RC. Dráhy: (1) proteinový standard, (2) *Rsb.* sp. COL2P, (3) *Erb.* sp. NAP1. RC indikují tři polypeptidové podjednotky H, M, L. Anténa LH1 je znázorněna dvěma polypeptidy  $\alpha$  a  $\beta$ .

## 7.4 Složení karotenoidů

### 7.4.1 AAP s karotenoidy „rhodobacterového“ typu

Jak bylo uvedeno v kapitole 2.1.1, AAP se rozděluje dle obsahu karotenoidů na pět skupin. AAP s karotenoidy „rhodobacterového“ typu se vyznačují vysokou podobností s AnAP *Rhodobacter sphaeroides*, což platí především pro složení pigmentů. Nejprve se tedy budu věnovat karotenoidovému složení bakterie *Rba. sphaeroides*.

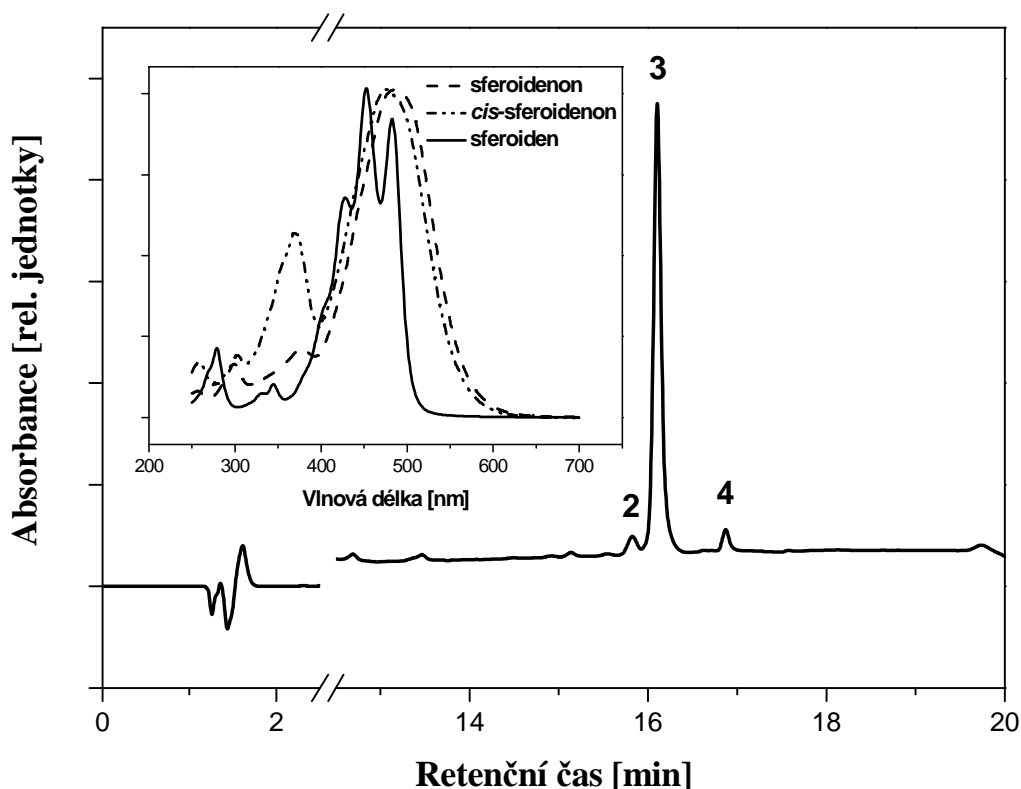
Na obrázku 7-14 je vidět HPLC chromatogram pigmentového extraktu z membrán *Rba. sphaeroides* zaznamenaný při 490 nm. Jako hlavní karotenoidy jsem na základě porovnání absorpčních *in vitro* spekter a retenčních časů s autentickými standardy určil sferoidenon a sferoiden. Přítomen je také minoritní hydroxy-sferoidenon, jehož absorpční *in vitro* spektrum je téměř shodné s absorpčním spektrem sferoidenonu.



Obr. 7-14

HPLC pigmentového extraktu z membrán bakterie *Rba. sphaeroides*. Pigmenty byly extrahovány do směsi aceton : methanol (7 : 2). Chromatogram byl zaznamenan při 490 nm. Identifikace pigmentů: 1 – hydroxy-sferoidenon, 3 – sferoidenon, 4 – sferoiden. Vložena jsou *online* absorpční spektra sferoidenonu (plná čára) a sferoidenu (přerušovaná čára).

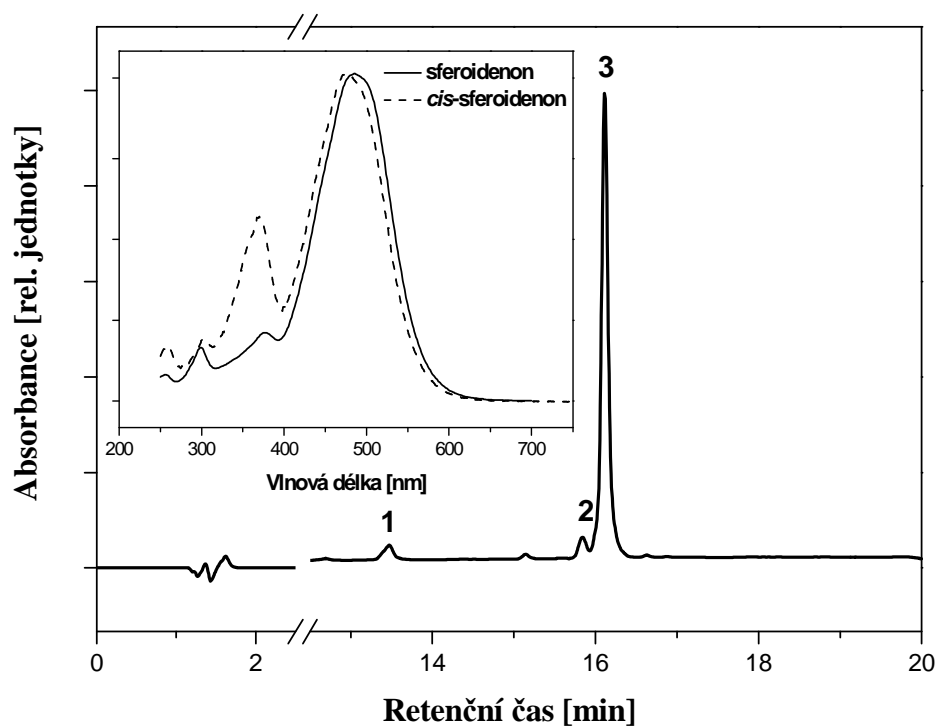
HPLC chromatogram pigmentového extraktu z membrán kmene *Zun-kholbo* je znázorněn na obrázku 7-15. Chromatogram byl zaznamenán při 490 nm. Na základě porovnání absorpčních *in vitro* spekter a retenčních časů s autentickými standardy jsem jako hlavní karotenoid stanovil sferoidenon, jako minoritní karotenoidy jsem určil sferoiden a *cis*-sferoidenon.



Obr. 7-15

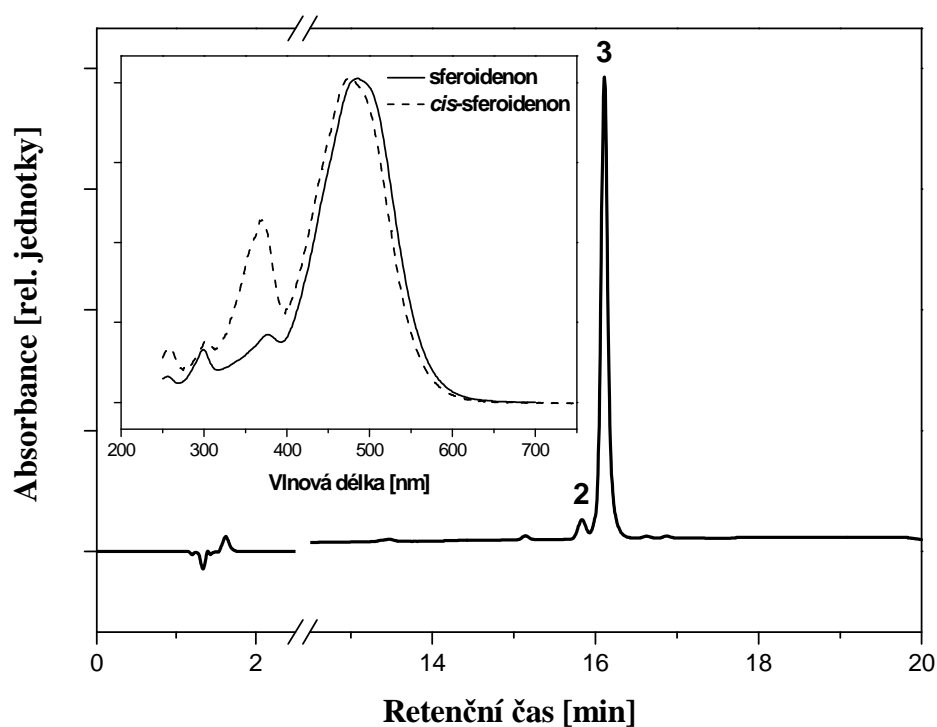
HPLC pigmentového extraktu z membrán kmene *Zun-kholbo*. Pigmenty byly extrahovány do směsi aceton : methanol (7 : 2). Chromatogram byl zaznamenán při 490 nm. Identifikace pigmentů: 2 – *cis*-sferoidenon, 3 – sferoidenon, 4 – sferoiden. Vložena jsou *online* absorpční spektra *cis*-sferoidenonu (čerchovaná čára), sferoidenonu (přerušovaná čára) a sferoidenu (plná čára).

Na obrázcích 7-16 a 7-17 na následující straně jsou uvedeny HPLC chromatogramy pigmentových extraktů z membrán kmenů *Dor-2m* a *Dor-vul*. Chromatogramy byly zaznamenány při 490 nm. Pigmenty jsem určil na základě porovnání absorpčních *in vitro* spekter a retenčních časů s autentickými standardy. U obou kmenů je majoritním karotenoidem sferoidenon, dále oba kmeny obsahují minoritní *cis*-sferoidenon. Kmen *Dor-2m* obsahuje ještě minoritní derivát sferoidenonu, hydroxy-sferoidenon, jehož absorpční *in vitro* spektrum je téměř shodné s absorpčním spektrem sferoidenonu.



Obr. 7-16

HPLC pigmentového extraktu z membrán kmene Dor-2m. Pigmenty byly extrahovány do směsi aceton : methanol (7 : 2). Chromatogram byl zaznamenán při 490 nm. Identifikace pigmentů: 1 – hydroxy-sferoidenon, 2 – *cis*-sferoidenon, 3 – sferoidenon. Vložena jsou *online* absorpční spektra *cis*-sferoidenonu (přerušovaná čára) a sferoidenonu (plná čára).



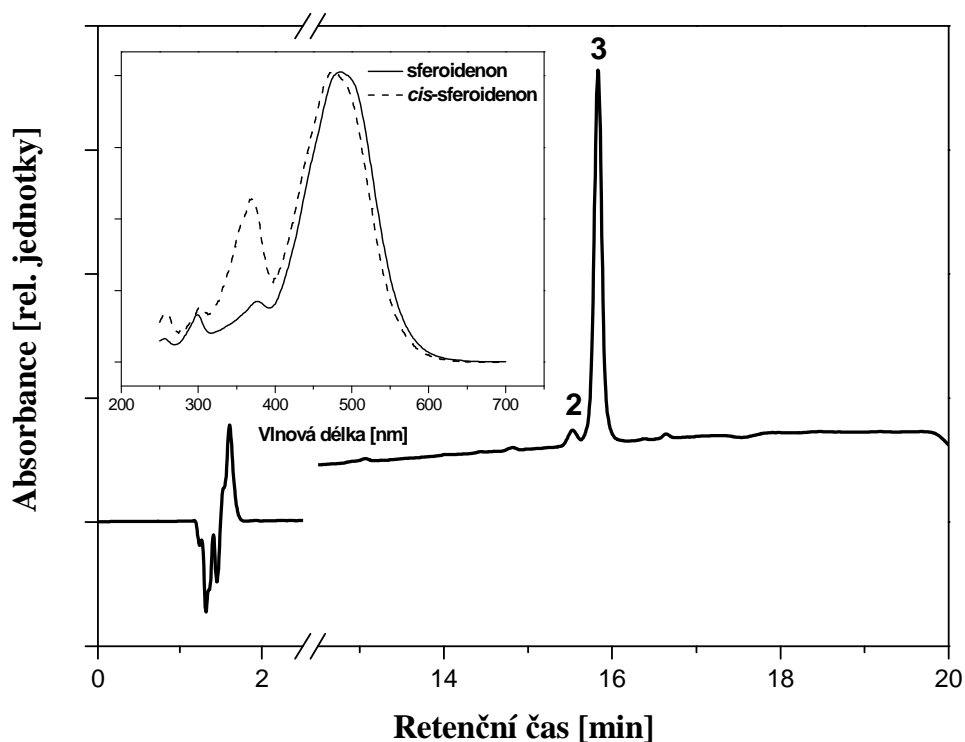
Obr. 7-17

HPLC pigmentového extraktu z membrán kmene Dor-vul. Pigmenty byly extrahovány do směsi aceton : methanol (7 : 2). Chromatogram byl zaznamenán při 490 nm. Identifikace pigmentů: 2 – *cis*-sferoidenon, 3 – sferoidenon. Vložena jsou *online* absorpční spektra *cis*-sferoidenonu (přerušovaná čára) a sferoidenonu (plná čára).



Obrázek 7-18 znázorňuje HPLC chromatogram pigmentového extraktu z membrán bakterie *Roseobacter* sp. COL2P. Chromatogram byl zaznamenán při 490 nm. Pigmenty jsem opět určil na základě absorpčních *in vitro* spekter a retenčních časů porovnáním s autentickými standardy. Hlavním karotenoidem je sferoidenon, přítomen je i minoritní karotenoid *cis*-sferoidenon. Přítomnost sferoidenonu i *cis*-sferoidenonu v komplexu LH1-RC jsem prokázal vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií pigmentového extraktu z frakce LH1-RC izolované z bakterie *Rsb.* sp. COL2P (chromatogram neuveden). Sferoidenon a *cis*-sferoidenon tedy mají světlosběrnou funkci.

Přehled všech identifikovaných karotenoidů je uveden v tabulce 7-1.



Obr. 7-18

HPLC pigmentového extraktu z membrán bakterie *Rsb.* sp. COL2P. Pigmenty byly extrahovány do směsi aceton : methanol (7 : 2). Chromatogram byl zaznamenán při 490 nm. Identifikace pigmentů: 2 – *cis*-sferoidenon, 3 – sferoidenon. Vložena jsou *online* absorpční spektra *cis*-sferoidenonu (přerušovaná čára) a sferoidenonu (plná čára).

Tab. 7-1

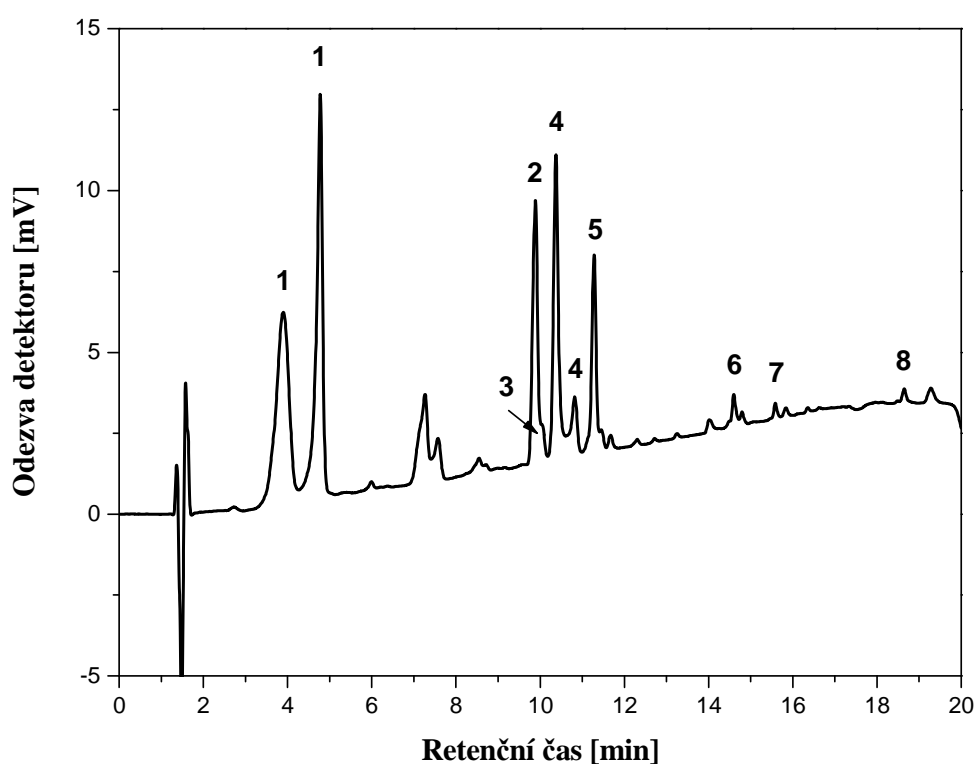
Přehled identifikovaných pigmentů v membránových extraktech z kmenů Zun-kholbo, Dor-2m, Dor-vul a COL2P. Tabulka uvádí retenční časy a absorpční maxima z *online* absorpčních spekter jednotlivých pigmentů. Čísla vrcholů odpovídají číslům uvedeným na obrázcích 7-14 až 7-18.

Č. vrcholů	R <sub>t</sub> [min]	Název pigmentu	λ <sub>max</sub> [nm]
1	13,5	hydroxy-sferoidenon	485
2	15,8	<i>cis</i> -sferoidenon	477
3	16,1	sferoidenon	485
4	16,9	sferoiden	428, 453, 483

### 7.4.2 AAP s karotenoidy erythrobacterového typu

Karotenoidy erb. typu jsou zcela unikátní, vyskytují se jen u této skupiny AAP. Dominantní jsou zde karotenoidové sulfáty, typické je také zastoupení  $\beta$ -karotenu a jeho derivátů.

Na obrázku 7-19 na následující straně je uveden chromatogram HPLC extraktu z membrán bakterie *Erythrobacter* sp. NAP1. Chromatogram byl zaznamenán při 490 nm. Pigmenty jsem identifikoval na základě absorpčních *in vitro* spekter a retenčních časů porovnáním s autentickými standardy (absorpční spektra jednotlivých pigmentů jsou uvedena dále). Jako hlavní membránový karotenoid jsem určil erythroxanthinsulfát, přehled dalších identifikovaných karotenoidů shrnuje tabulka 7-2 na straně 75.

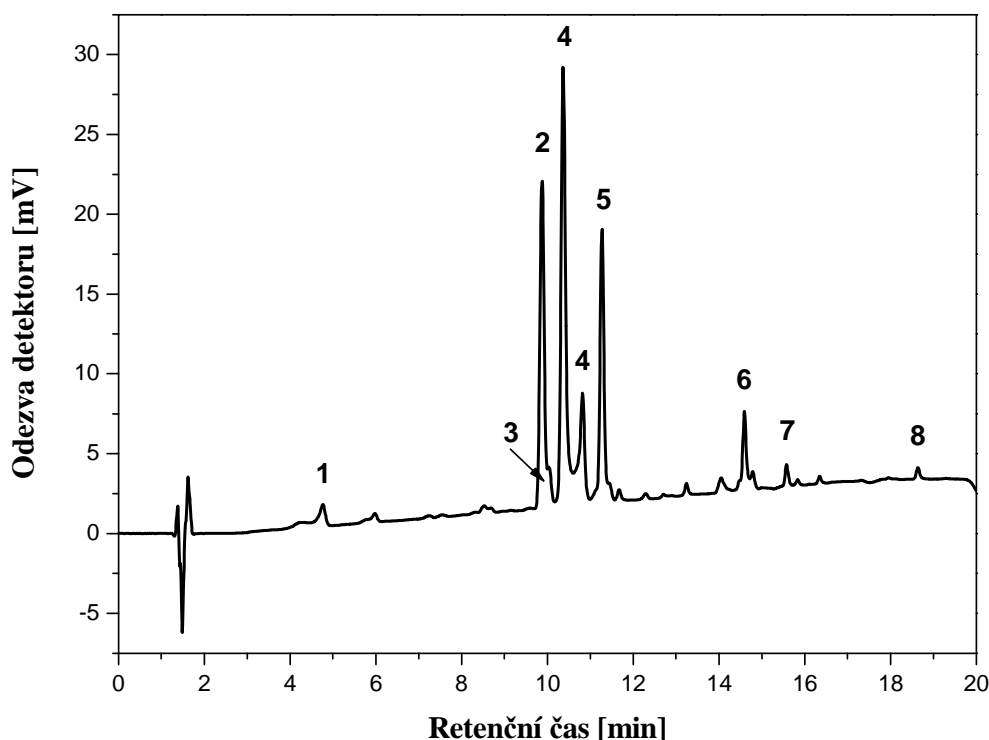


Obr. 7-19

HPLC pigmentového extraktu z membrán bakterie *Erb.* sp. NAP1. Pigmenty byly extrahovány do methanolu. Chromatogram byl zaznamenán při 490 nm. Identifikace pigmentů: 1 – erythroxanthin-sulfát (2 izomery), 2 – erythroxanthin, 3 – kaloxanthin, 4 – bakteriorubixanthinal (2 izomery), 5 – zeaxanthin, 6 – spirilloxanthin, 7 – kryptoxanthin, 8 –  $\beta$ -karoten.

Obrázek 7-20 na následující straně znázorňuje chromatogram HPLC extraktu z purifikovaného komplexu LH1-RC izolovaného z bakterie *Erb.* sp. NAP1. Chromatogram byl zaznamenán při 490 nm. Pigmenty jsem opět identifikoval na základě absorpčních *in vitro* spekter a retenčních časů porovnáním s autentickými standardy (absorpční spektra jednotlivých pigmentů jsou uvedena dále). Hlavní membránový karotenoid erythroxanthin-

sulfát není již v extraktu z komplexů LH1-RC prakticky přítomen, nejedná se tudíž o světlosběrný karotenoid. Identifikoval jsem tři hlavní světlosběrné karotenoidy: bakteriorubixanthinal, zeaxanthin a erythroanthin. Dále jsem detekoval minoritní fotosyntetické karotenoidy: spirilloxanthin, kaloxanthin, kryptoxanthin a  $\beta$ -karoten (tab. 7-2).



Obr. 7-20

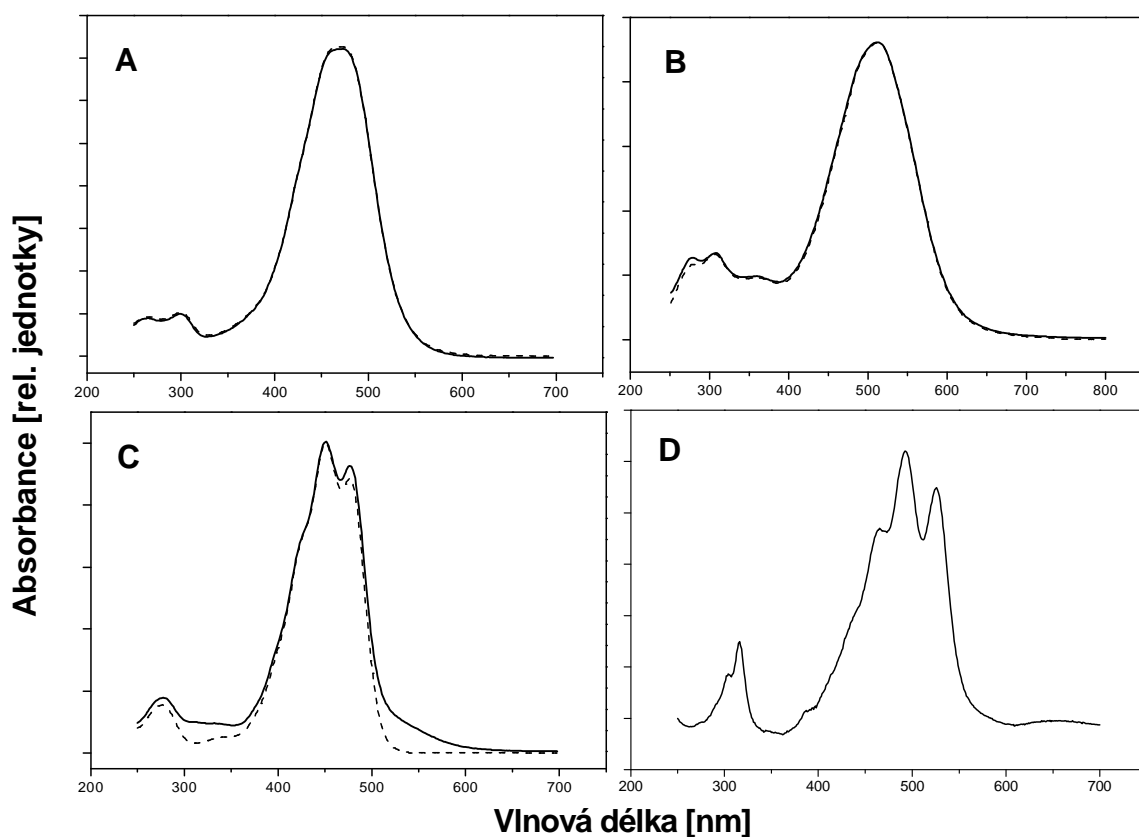
HPLC pigmentového extraktu z komplexu LH1-RC bakterie *Erb. sp. NAP1*. Pigmenty byly extrahovány do methanolu. Chromatogram byl zaznamenán při 490 nm. Identifikace pigmentů: 1 – erythroanthinsulfát, 2 – erythroanthin, 3 – kaloxanthin, 4 – bakteriorubixanthinal (2 izomery), 5 – zeaxanthin, 6 – spirilloxanthin, 7 – kryptoxanthin, 8 –  $\beta$ -karoten.

Tab. 7-2

Přehled identifikovaných pigmentů v membránovém extraktu z bakterie *Erb. sp. NAP1*. V tabulce jsou uvedeny retenční časy a absorpční maxima z *online* absorpčních spekter jednotlivých pigmentů. Čísla vrcholů odpovídají číslům uvedeným na obrázcích 7-19 a 7-20.

Č. vrcholů	R <sub>t</sub> [min]	Název pigmentu	$\lambda_{\text{max}}$ [nm]
1	3,9; 4,8	erythroanthinsulfát (2 izomery)	473
2	9,9	erythroanthin	473
3	10,0	kaloxanthin	(427), 450, 475
4	10,4; 10,8	bakteriorubixanthinal (2 izomery)	512
5	11,3	zeaxanthin	(427), 451, 475
6	14,6	spirilloxanthin	465, 492, 526
7	15,6	kryptoxanthin	(427), 451, 475
8	18,6	$\beta$ -karoten	(427), 451, 475

Na obrázku 7-21 jsou uvedena absorpční *in vitro* spektra karotenoidů identifikovaných v pigmentových extraktech z bakterie *Erythrobacter* sp. NAP1. Plnou čarou je vždy znázorněno absorpční spektrum zkoumaného pigmentu a přerušovanou čarou absorpční spektrum autentického standardu. Absorpční spektrum erythroanthinu je téměř shodné s uvedeným spektrem erythroanthinsulfátu (viz obr. 7-21A). Absorpční spektra  $\beta$ -karotenu a jeho derivátů kryptoxanthinu (hydroxy- $\beta$ -karoten) a kaloxanthinu (trihydroxy- $\beta$ -karoten) jsou téměř totožná s absorpčním spektrem uvedeného derivátu  $\beta$ -karotenu, tj. zeaxanthinem (dihydroxy- $\beta$ -karoten) (viz obr. 7-21C). Absorpční maxima jednotlivých karotenoidů jsou uvedena v tabulce 7-2 (strana 75).



Obr. 7-21

Absorpční spektra (v eluátu HPLC) pigmentů extrahovaných z bakterie *Erythrobacter* sp. NAP1 (plná čára) a autentických standardů (přerušovaná čára). A) erythroanthinsulfát. B) bakteriorubixanthin. C) zeaxanthin. D) spirilloxanthin.

## 7.5 Stechiometrie pigmentů

Pro určení stochiometrie pigmentů ve světlosběrném komplexu jsem spektrofotometricky stanovil množství BChl *a* a sferoidenonu ve vzorcích extraktů z buněk a membrán několika kmenů AAP. Extrakci jsem provedl do směsi aceton : methanol (7 : 2). Koncentrace

BChl *a* a sferoidenonu jsem vypočítal dle rovnic (1) a (2), uvedených v kapitole 6.8.2. Koncentrační poměr sferoidenon / BChl *a* pak udává stechiometrii pigmentů ve světlosběrné anténě. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 7-3. Obecným trendem u AAP je snižování poměru sferoidenon / BChl *a* ve směru buňky → membrány. Tento trend potvrzují výsledky získané z kmenů COL2P, Zun-kholbo a Dor-vul. Naproti tomu u kmene Dor-2m můžeme pozorovat trend právě opačný, tedy vyšší poměr sferoidenon / BChl *a* v membránách než v celých buňkách.

Tab. 7-3

Přehled spektrofotometricky stanovené stechiometrie pigmentů ve světlosběrném komplexu jednotlivých kmenů AAP.

Kmen	Extrakt	C <sub>sferoidenon</sub> /C <sub>BChl a</sub>	Směrodatná odchylka
COL2P	buňky	1,70	±0,03
	membrány	1,59	±0,07
Zun-kholbo	buňky	1,52	±0,01
	membrány	1,26	±0,01
Dor-vul	buňky	1,18	±0,01
	membrány	1,11	±0,01
Dor-2m	buňky	1,20	±0,01
	membrány	1,54	±0,01

Pozn.: (střední hodnota±S.D., n=3)

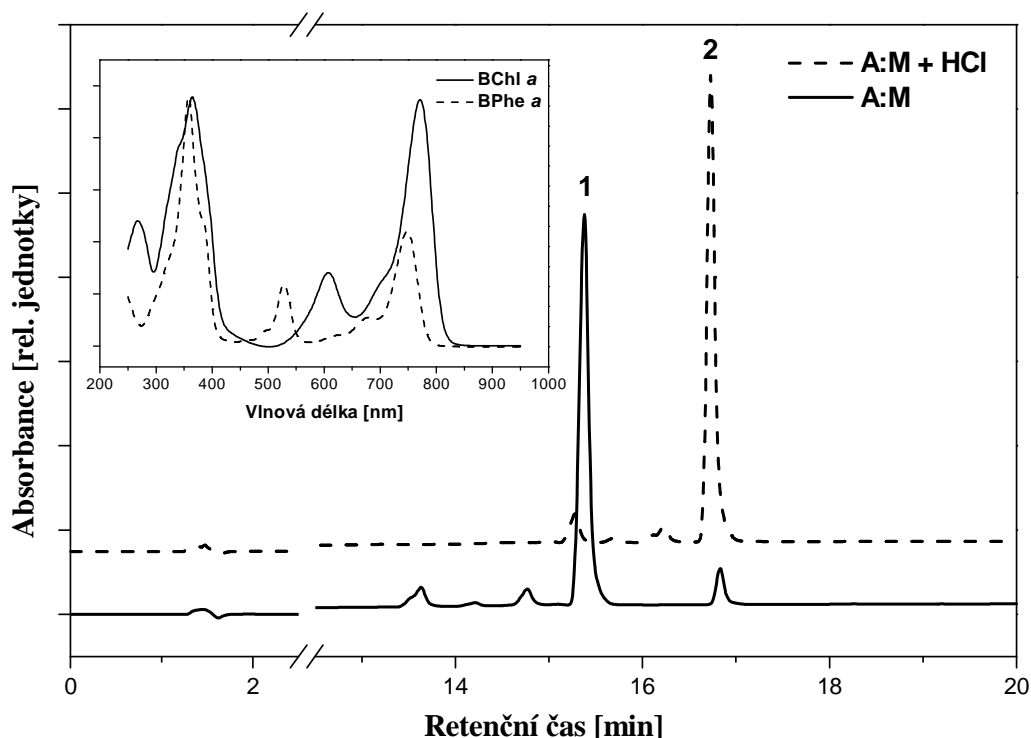
## 7.6 Velikost fotosyntetické jednotky

Počet molekul BChl *a* vázaných ve fotosyntetických komplexech, tj. velikost fotosyntetické jednotky (PSU), jsem určil z pigmentových extraktů membrán a buněk. Extrakty jsem analyzoval pomocí HPLC, stejné extrakty jsem poté okyselil 5 µl 37% HCl a reanalyzoval. Chromatogramy byly zaznamenány při 750 nm, tedy vlnové délce, při níž absorbuje BPhe *a*. Principem je feofytinizace všech molekul BChl *a* na molekuly BPhe *a* okyselením. Počet molekul BChl *a* na jedno RC jsem poté vypočítal podle rovnice (3):

$$N_{BChl} = \left( \frac{A_{ACID} - A_{NORM}}{A_{NORM}} \right) \cdot 2 \quad (3)$$

kde  $A_{ACID}$  udává plochu vrcholu BPhe *a* po okyselení a  $A_{NORM}$  udává plochu vrcholu BPhe *a* před okyselením (viz obrázek 7-22 na straně 78). Násobení celé rovnice dvěma

vychází z faktu, že každé RC obsahuje dvě molekuly BPhe *a*. Tato metoda výpočtu velikosti PSU je velice jednoduchá, neboť nevyžaduje znalost žádných absorpčních koeficientů.



Obr. 7-22

HPLC chromatogramy pigmentového extraktu z membrán kmene NAP1 zaznamenané při 750 nm. Plná čára znázorňuje analýzu před okyselením, přerušovaná čára analýzu po okyselení (vertikálně posunuto). Vložena jsou *online* absorpční spektra BChl *a* (plná čára) a BPhe *a* (přerušovaná čára). Vysvětlivky: 1 – BChl *a* ( $R_t = 15,4$  min), 2 – BPhe *a* ( $R_t = 16,7$  min), A : M – aceton : methanol.

Velikost fotosyntetické jednotky (PSU), tedy počet molekul BChl *a* vázaných ve fotosyntetických komplexech, jsem takto stanovil pro několik kmenů AAP. Pro srovnání jsem vypočítal také velikost PSU typické purpurové bakterie *Rhodobacter sphaeroides*. V membránách této bakterie obsahuje  $122,2 \pm 2,3$  molekul BChl *a* na jedno RC, tedy několikrát více než jsem detekoval v membránách zkoumaných kmenů AAP. Paradoxně v buněčných extraktech jednotlivých kmenů AAP je přítomen vyšší počet molekul BChl *a* než je tomu v extraktech z membrán. Výsledky shrnuje tabulka 7-4 na následující straně.

Tab. 7-4

Přehled zjištěných velikostí fotosyntetických jednotek (PSU) jednotlivých kmenů AAP a purpurové bakterie *Rhodobacter sphaeroides*.

Kmen	Extrakt	Velikost PSU	Směrodatná odchylka
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	buňky	97,8	±4,6
	membrány	122,2	±2,3
NAP1	buňky	28,5	±0,5
	membrány	26,5	±0,6
COL2P	buňky	25,5	±2,4
	membrány	17,4	±5,0
Zun-kholbo	buňky	-	-
	membrány	29,0	±0,9
Dor-vul	buňky	-	-
	membrány	25,3	±0,6
Dor-2m	buňky	23,2	±0,3
	membrány	9,4	±1,9

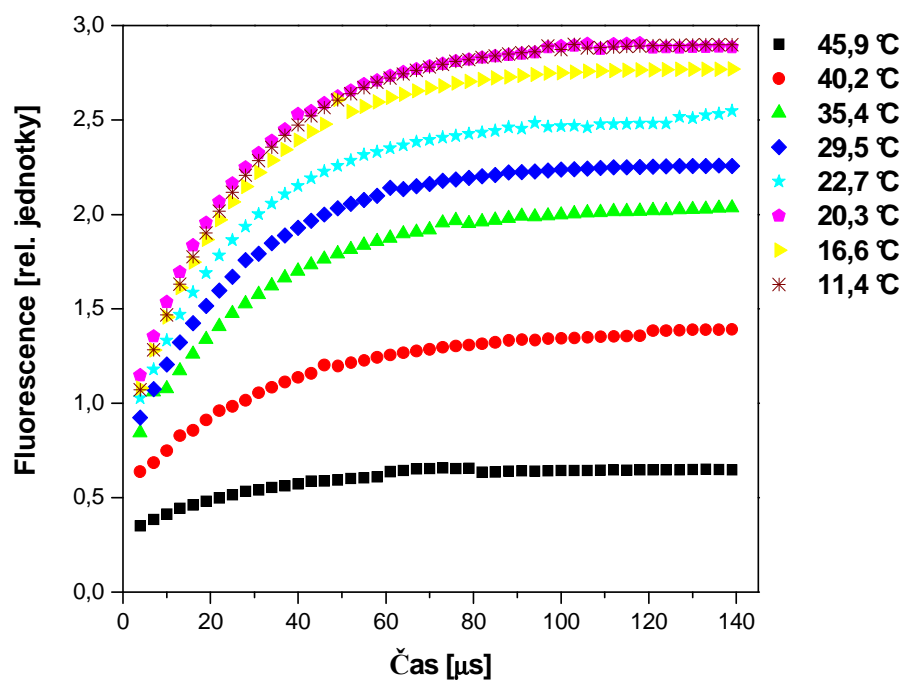
Pozn.: (střední hodnota±S.D., n=3)

## 7.6 Fotochemická aktivita komplexu LH1-RC

Funkčnost purifikovaného komplexu LH1-RC z bakterie *Erythrobacter* sp. NAP1 jsem ověřil fluorescenčním měřením pomocí fluorimetru FL-100 (postup viz kapitola 6.9.2).

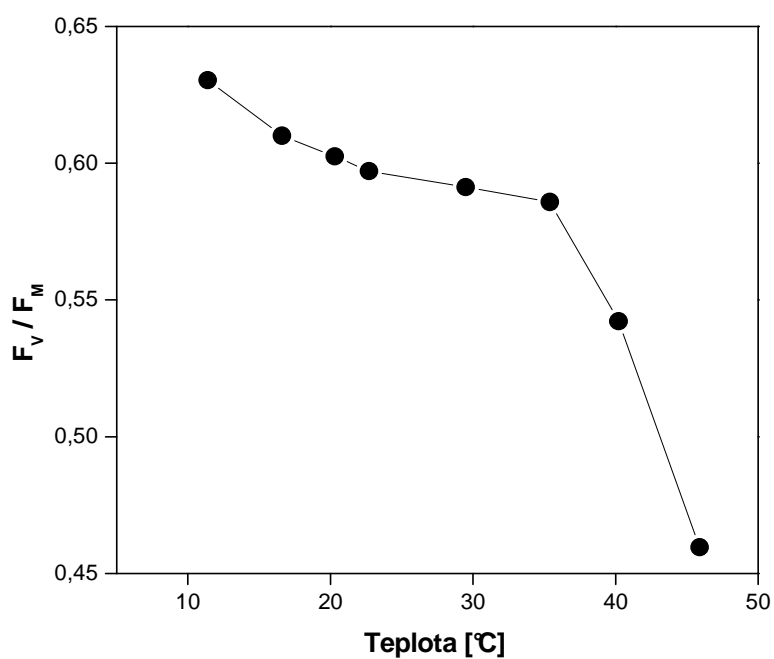
Na obrázku 7-23 na následující straně je znázorněna indukce fluorescence BChl *a* v komplexu LH1-RC v závislosti na teplotě. Typická indukční křivka dokazuje, že purifikovaný komplex LH1-RC je fotosynteticky funkční. Patrný je trend snižování fotochemické aktivity LH1-RC se zvyšující se teplotou.

Obrázek 7-24 na následující straně zobrazuje teplotní stabilitu purifikovaného komplexu LH1-RC izolovaného z bakterie *Erythrobacter* sp. NAP1. Stabilita LH1-RC komplexu je vyjádřena změnou poměru fluorescenčních parametrů  $F_V / F_M$  v závislosti na měnící se teplotě. Poměr  $F_V / F_M$  udává kvantový výtěžek primární separace nábojů. Maximální výtěžek jsem detekoval při teplotě 11,4 °C ( $F_V / F_M = 0,63$ ). Z grafu je dále patrné, že komplex LH1-RC je stabilní asi do 35 °C, pak již začíná jeho fotochemická aktivita prudce klesat.



Obr. 7-23

Indukce fluorescence BChl *a* vázaného v komplexu LH1-RC bakterie *Erythrobacter* sp. NAP1 v závislosti na teplotě.



Obr. 7-24

Graf udává teplotní stabilitu komplexu LH1-RC izolovaného z bakterie *Erythrobacter* sp. NAP1. Vysvětlivky:  $F_m$  – maximální fluorescence,  $F_v$  – variabilní fluorescence.



## 8 Diskuze

AAP charakterizuje nízký počet membránových fotosyntetických komplexů, což značně ztěžuje jejich izolaci a purifikaci. Membrány aerobních anoxygenních fototrofů jsou navíc poměrně rezistentní vůči tenzidům a obsahují také velké množství karotenoidů (Shimada, 1995). Proto bylo nutné solubilizovat membrány s relativně vysokou koncentrací LDAO (1 %). Z důvodu udržení fotochemické aktivity LH1-RC komplexů jsem všechny purifikační procesy prováděl ve tmě při 4 °C.

Různorodost AAP se projevuje i při použití izolačních postupů pro přípravu fotosyntetických komplexů. Není tak možné použít jeden izolační protokol, nýbrž je nutné jej upravovat pro jednotlivé druhy AAP na základě jejich konkrétních vlastností. Pravděpodobně nejpalčivějším bodem je zjištění optimální koncentrace tenzidu pro solubilizaci membrán. Kromě vlastností jednotlivých druhů AAP je tato koncentrace ovlivněna ještě dalším faktorem, výchozím množstvím bakteriální kultury. Pro izolaci LH1-RC z bakterie *Erythrobacter* sp. NAP1 (250 ml výchozí buněčné suspenze) se 1% koncentrace tenzidu LDAO jevila jako optimální, což dokumentuje čistota purifikovaného LH1-RC ( $A_{276}/A_{867} = 0,48$ ), která je v dobré shodě s  $A_{276}/A_{880} = 0,44$  vysoce purifikovaného LH1-RC z purpurové bakterie *Rhodobium marinum* (Qian *et al.*, 2000). Ovšem při izolaci LH1-RC z bakterie *Roseobacter* sp. COL2P došlo k degradaci celého komplexu a následnému odtržení antény LH1. Na absorpčním spektru této frakce můžeme vidět již pouze jakýsi pozůstatek RC (viz obrázek 7-10 na straně 67). Ztráta antény LH1 byla pravděpodobně způsobena právě vysokou 1% koncentrací LDAO vzhledem k menšímu výchozímu množství buněčné suspenze *Rsb.* sp. COL2P (50 ml). Z výše uvedeného plyne, že kmen NAP1 je při solubilizaci membrán stabilnější a dokáže účinněji odolávat tenzidům než kmen COL2P. Volba optimální koncentrace tenzidu pro solubilizaci membrán tak představuje klíčovou podmínku úspěšné izolace fotosyntetických komplexů.

Analýzy fotosyntetických aparátů prokázaly, že všechny zkoumané kmeny představují typické fotoheterotrofní bakterie a obsahují bakteriální reakční centrum typu 2.

UV-Vis absorpční spektra intaktních membrán v blízké infračervené oblasti charakterizují vrcholy s vysokou intenzitou (867-873 nm) a vrcholy s nízkou intenzitou (799-801 nm) (viz obrázky 7-4 a 7-5 na straně 63, 7-6 na str. 64, 7-7 na str. 65 a 7-9 na str. 66), jež jsou typické pro BChl *a*. Absorpční maxima okolo 870 nm odpovídají BChl *a* B870 vázanému ve vnitřní anténě LH1. Malá absorpční maxima BChl *a* kolem 800 nm

ukazují na přítomnost RC. Periferní antény LH2 nejsou u zkoumaných kmenů AAP přítomny. To dokumentuje srovnání s absorpčním spektrem purpurové bakterie *Rba. sphaeroides*, kde jsou patrná intenzivní maxima při 800 a 850 nm (viz obrázek 7-3 na straně 62), která odpovídají BChl *a* vázaným v periferním komplexu LH2. Spektrální analýzy fotosyntetického aparátu zkoumaných kmenů AAP jsou v souladu s literaturou, konkrétně pro *Erythrobacter* sp. NAP1 (Koblížek *et al.*, 2003), *Roseobacter* sp. COL2P (Koblížek *et al.*, 2010) a *Roseinatronobacter monicus* (Boldareva *et al.*, 2007).

Při srovnání absorpčních spekter membrán a celých buněk kmene Dor-vul (obr. 7-4 na straně 63), Zun-kholbo (obr. 7-6 na str. 64), NAP1 (obr. 7-7 na str. 65) a COL2P (obr. 7-9 na str. 66) je vidět jasně patrný nárůst absorpance BChl *a* ( $\lambda \sim 870$  nm) v izolovaných membránách oproti celým buňkám, což odpovídá vyšší koncentraci BChl *a* v membránách. V případě kmene Dor-2m je tomu právě naopak (obr. 7-5 na str. 63), způsobeno je to pravděpodobně degradací určitého množství BChl *a* během přípravy membrán.

Fotosyntetický aparát jsem z hlediska proteinového zastoupení charakterizoval pomocí elektroforézy v prostředí SDS.

V membránách všech zkoumaných kmenů AAP jsem prokázal přítomnost tří podjednotek RC (H, M a L) a přítomnost komplexu cyt *bc*<sub>1</sub> (viz obrázky 7-11 a 7-12 na straně 68). V membránové frakci bakterie *Rhodobacter sphaeroides* jsem identifikoval čtyři podjednotky komplexu cyt *bc*<sub>1</sub> (cyt *b*, cyt *c*<sub>1</sub>, FeS protein a podjednotka IV), což je v souladu s literaturou (Jungas *et al.*, 1999). V případě zkoumaných kmenů AAP není zastoupení jednotlivých podjednotek komplexu cyt *bc*<sub>1</sub> zcela průkazné a od *Rba. sphaeroides* se liší především v přítomnosti či nepřítomnosti podjednotky IV.

Dále jsem pomocí SDS-PAGE sledoval proteinové složení purifikovaných LH1-RC z bakterií *Erythrobacter* sp. NAP1 a *Roseobacter* sp. COL2P (viz obrázek 7-13 na str. 69).

V případě kmene NAP1 jsem identifikoval tři podjednotky RC (H = 28,6 kDa, M = 27,1 kDa a L = 25,7 kDa) a dva polypeptidy komplexu LH1 ( $\alpha$  = 9,5 kDa a  $\beta$  = 7,3 kDa). Velikosti těchto podjednotek se však výrazně liší od skutečných hodnot, které jsem vypočítal na základě aminokyselinového složení získaného shotgun sekvenováním úplného genomu bakterie *Erythrobacter* sp. NAP1 ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NZ\\_AAMW01000003.1](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NZ_AAMW01000003.1)). Ve skutečnosti je tedy největší podjednotkou RC podjednotka M (34,7 kDa), následuje podjednotka L (30,9 kDa) a nejmenší je podjednotka H (29,5 kDa). Skutečné velikosti polypeptidů  $\alpha$  a  $\beta$  antény LH1 jsou potom 7,5 kDa, respektive 5 kDa.

Ve frakci LH1-RC získané z kmene COL2P jsem potvrdil přítomnost podjednotek RC (H = 29,3 kDa, M = 27,1 kDa a L = 25 kDa) nikoliv však přítomnost polypeptidů komplexu LH1 (obr. 7-13 na str. 69). To potvrzuje i spektrální analýza této frakce, z níž je patrné odtržení antény LH1 během purifikace (viz obrázek 7-10 na straně 67). Stejně spektrum ukazuje i na možnou přítomnost podjednotky C reakčního centra, tetrahemového cyt *c* (absorpční vrchol při 417 nm). Podle dřívější studie velikost tetrahemového cyt *c* AAP *Erythromonas ursincola* odpovídá přibližně 40 kDa (Yurkov *et al.*, 1998c). Z obrázku 7-13 na straně 69 (dráha 2) je sice patrná přítomnost proteinu o podobné velikosti, nicméně k potvrzení, zda se opravdu jedná o podjednotku C, je nutný další výzkum.

Všechny aerobní anoxygenní fototrofní bakterie syntetizují velké množství karotenoidů (vzhledem k množství BChl *a*). Složení karotenoidů většiny AAP se značně odlišuje od AnAP, hlavně přítomností „nefotosyntetických“ karotenoidů (Shimada, 1995; Yurkov a Beatty, 1998a). Minoritní skupinu tvoří AAP, které se svým karotenoidovým složením významně podobají AnAP, charakterizuje je tedy přítomnost sferoidenonu a sferoidenu (Takaichi, 1999). Oba pigmenty pocházejí ze stejné biosyntetické dráhy, přičemž sferoidenon se syntetizuje ze sferoidenu monooxygenasovou reakcí. Celá reakce je závislá na přítomnosti či nepřítomnosti kyslíku (Scolnik *et al.*, 1980), takže AnAP syntetizují přednostně sferoiden, zatímco AAP sferoidenon.

Typickou fotoheterotrofní bakterii představuje kmen NAP1, jehož hlavním membránovým karotenoidem je polární „nefotosyntetický“ erythroanthinsulfát (viz obrázek 7-19 na straně 74). Kmen NAP1 tak můžeme zařadit do AAP s tzv. erythrobacterovým typem karotenoidů (Takaichi, 1999). Ze srovnání absorpčních spekter membrány a purifikovaného komplexu LH1-RC tohoto kmene (viz obrázky 7-7 a 7-8 na straně 65) je vidět, že jen malé množství elektromagnetického záření absorbovaného karotenoidy je přeneseno do reakčního centra, což je v souladu s dříve publikovanými excitačními spektry (Koblížek *et al.*, 2003). Potvrzuje to i HPLC pigmentového extraktu z LH1-RC (viz obrázek 7-20 na straně 75), podle níž jsou hlavními fotosyntetickými karotenoidy erythroanthin, bakteriorubixanthinal a zeaxanthin (přehled všech identifikovaných karotenoidů shrnuje tabulka 7-2 na straně 75). Naproti tomu dominantní membránový karotenoid erythroanthinsulfát není vázán ani v reakčním centru ani ve světlosběrném komplexu (viz obrázek 7-20 na straně 75) a neplní tak světlosběrnou funkci.

Složení karotenoidů kmenů Zun-kholbo, Dor-vul, Dor-2m a COL2P je odlišné. Tyto kmeny totiž neobsahují „nefotosyntetické“ pigmenty, navíc se svým zastoupením karotenoidů podobají purpurové bakterii *Rhodobacter sphaeroides* (viz obrázek 7-14 na straně 70). Všechny zmíněné kmeny mají stejný hlavní fotosyntetický karotenoid, tj. sferoidenon, jenž je zodpovědný za absorpci většiny světelného záření z modré a zelené oblasti slunečního spektra. Navzájem se však odlišují ve složení minoritních karotenoidů. Kmeny Dor-vul a COL2P obsahují kromě sferoidenonu také *cis*-sferoidenon (viz obrázek 7-17 na straně 72 a 7-18 na straně 73), kmen Dor-2m *cis*-sferoidenon a hydroxy-sferoidenon (viz obrázek 7-16 na straně 72) a kmen Zun-kholbo *cis*-sferoidenon a sferoidenon (viz obrázek 7-15 na straně 71). Přehled všech identifikovaných karotenoidů je uveden v tabulce 7-1 na straně 73.

Stechiometrii pigmentů ve světlosběrném komplexu zkoumaných kmenů AAP jsem sledoval pomocí poměru koncentrací sferoidenonu a BChl *a*. Při izolaci membrán z buněk dochází ke snížení obsahu karotenoidů. Jedná se o volné karotenoidy, které nejsou vázané v membránách. To dokumentují nižší hodnoty koncentračního poměru sferoidenonu a BChl *a* v membránovém extraktu oproti extraktu z buněk (viz tabulka 7-3 na straně 77). U kmene Dor-2m je tomu právě naopak. V tomto případě pravděpodobně došlo k degradaci BChl *a* během přípravy membrán, což má při zachovaném množství sferoidenonu za následek zvýšení poměru  $c_{\text{sferoidenon}}/c_{\text{BChl } a}$  v membránovém extraktu.

Strukturně komplex LH1 sestává z kruhově symetrických  $\alpha\beta$ -dimerních jednotek, přičemž každá jednotka váže dvě molekuly BChl *a* a jednu molekulu karotenoidu (Cogdell a Lindsay, 2000). Počet těchto dimerů závisí na druhu bakterie. Obecně se za nejpravděpodobnější model považuje uspořádání s 16 dimery  $\alpha\beta$  (32 molekul BChl *a*) (Karrasch *et al.*, 1995). Tento model nahradil model starší s 12 dimery  $\alpha\beta$  (24 molekul BChl *a*) (Meckenstock *et al.*, 1992a; Meckenstock *et al.*, 1992b).

Velikost fotosyntetických jednotek u zkoumaných kmenů AAP se pohybuje od  $23,2 \pm 0,3$  do  $29,0 \pm 0,9$  molekul BChl *a* na jedno RC (viz tabulka 7-4 na straně 79). Takovýto počet molekul BChl *a* by spíše ukazoval na model LH1 s 12 dimery  $\alpha\beta$ , který ovšem nevytváří dostatečný prostor pro obklopení RC. Další možností je struktura LH1 jako neuzavřeného „kruhu“, jenž se skládá z 13 dimerů  $\alpha\beta$  (26 molekul BChl *a*) a proteinu pufX, který právě brání uzavření „kruhu“ (Scheuring *et al.*, 2005). K potvrzení přesné struktury komplexu LH1-RC budou nutné další analýzy.

Z výsledků (tabulka 7-4 na straně 79) je patrný vyšší počet molekul BChl *a* na 1 RC v extraktech z buněk než z membrán, což je pravděpodobně způsobeno degradací určitého počtu molekul BChl *a* při izolaci membrán. V každém případě je velikost PSU u AAP několikrát nižší než ta, kterou jsem stanovil pro AnAP *Rhodobacter sphaeroides* ( $122,2 \pm 2,3$ ). Je to dáno především absencí antény LH2 u všech zkoumaných kmenů AAP.

Funkčnost komplexu LH1-RC izolovaného z bakterie *Erb. sp. NAP1* jsem ověřil měřením indukce fluorescence v závislosti na teplotě (viz obrázek 7-23 na straně 80). Poměr  $F_V / F_M$ , jenž vyjadřuje kvantový výtěžek primární separace nábojů, dosahuje maximální hodnoty při teplotě 11,4 °C, kdy  $F_V / F_M = 0,63$  (viz obrázek 7-24 na straně 80). Tato hodnota je nižší než hodnota poměru  $F_V / F_M = 0,82$ , která byla naměřena v živých buňkách stejného bakteriálního druhu (Koblížek *et al.*, 2003). Pravděpodobně je to způsobeno tím, že izolované komplexy mají oproti živým buňkám zablokovanou donorovou stranu fotochemické reakce.

Obecně jsou AAP vysoce tolerantní vůči nepříznivým podmínkám (např. teplotě) (Yurkov a Csotonyi, 2009). Izolovaný komplex LH1-RC z *Erb. sp. NAP1* je tak relativně termostabilní, jeho fotochemická aktivita začíná klesat až při teplotě 35 °C (viz obrázek 7-24 na straně 80). Pro srovnání, komplex LH1-RC izolovaný z bakterie *Rsb. sp. COL2P* je stabilní dokonce až do 70 °C (Koblížek, nepublikovaná data).

## 9 Závěr

Shromáždil jsem aktuální znalosti o výskytu, fyziologii a metabolických pochodech aerobních anoxygenních fototrofních bakterií.

Z bakterie *Erythrobacter* sp. NAP1 se mi podařilo izolovat fotochemicky aktivní komplex LH1-RC ve velmi purifikovaném stavu. Tento komplex vykazuje relativně vysokou termostabilitu.

Na základě spektrální a HPLC analýzy jsem u všech zkoumaných kmenů AAP potvrdil přítomnost BChl *a* jako hlavního světlosběrného pigmentu a také vysoký obsah membránových karotenoidů.

Sferoidenon je u kmenů COL2P, Dor-vul, Dor-2m a Zun-kholbo dominantním membránovým karotenoidem a zároveň plní i světlosběrnou funkci. Majoritní membránový karotenoid u kmene NAP1 představuje „nefotosyntetický“ erythroxanthin-sulfát. Kmen NAP1 syntetizuje tři hlavní světlosběrné karotenoidy: erythroxanthin, bakteriorubixanthinal a zeaxanthin.

Vzhledem k absenci periferní antény LH2 u zkoumaných kmenů AAP je velikost jejich fotosyntetických jednotek několikrát nižší než v případě anaerobní purpurové bakterie *Rhodobacter sphaeroides*.

## Seznam použité literatury

- Anzenbacher, P., Kovář, J. (1986) Spektrofotometrické metody. V knize *Metody chemického výzkumu pro biochemiky*. Praha: Ministerstvo školství ČSR, str. 119–135.
- Bahatyrova, S., Frese, R.N., Siebert, C.A., Olsen, J.D., van der Werf, K.O., van Grondelle, R., Niederman, R.A., Bullough, P.A., Otto, C., Hunter, C.N. (2004) The Native architecture of a photosynthetic membrane. *Nature* **430**: 1058–1062.
- Beatty, J.T. (2002) On the natural selection and evolution of the aerobic phototrophic bacteria. *Photosynth Res* **73**: 109–114.
- Biebl, H., Allgaier, M., Tindall, B.J., Koblížek, M., Lünsdorf, H., Pukall, R., Wagner-Döbler, I. (2005a) *Dinoroseobacter shibae* gen. nov., sp. nov., a new aerobic phototrophic bacterium isolated from dinoflagellates. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**: 1089–1096.
- Biebl, H., Allgaier, M., Lünsdorf, H., Pukall, R., Tindall, B.J., Wagner-Döbler, I. (2005b) *Roseovarius mucosus* sp. nov., a member of the *Roseobacter* clade with trace amounts of bacteriochlorophyll *a*. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**: 2377–2383.
- Biebl, H., Tindall, B.J., Pukall, R., Lünsdorf, H., Allgair, M., Wagner-Döbler, I. (2006) *Roseovarius mucosus* clade with trace amounts of bacteriochlorophyll *a*. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**: 821–826.
- Biebl, H., Pukall, R., Lünsdorf, H., Schulz, S., Allgair, M., Tindall, B.J., Wagner-Döbler, I. (2007) Description of *Labrenzia alexandrii* gen. nov., sp. nov., a novel alphaproteobacterium containing bacteriochlorophyll *a*, and a proposal for reclassification of *Stappia aggregata* as *Labrenzia aggregata* comb. nov., of *Stappia marina* comb. nov. and of *Stappia alba* as *Labrenzia alba* comb. nov., and emended descriptions of the genera *Pannobacter*, *Stappia* and *Roseibium*, and of the species *Roseibium denhamense* and *Roseibium hamelinense*. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**: 1095–1107.
- Boldareva, E.N.: osobní sdělení.
- Boldareva, E.N., Bryantseva, I.A., Tsapin, A., Nelson, K., Sorokin, D.Y., Tourova, T.P., Boichenko, V.A., Stadnichuk, I.N., Gorlenko, V.M. (2007) The new alkaliphilic bacteriochlorophyll *a*-containing bacterium *Roseinatronobacter monicus* sp. nov.

- from the hypersaline soda Mono Lake (California, United States). *Microbiology* **76**: 82–92.
- Boldareva, E.N., Tourova, T.P., Kolganova, T.V., Moskalenko, A.A., Makhneva, Z.K., Gorlenko, V.M. (2009) *Roseococcus suduntuyensis* sp. nov., a new aerobic bacteriochlorophyll *a*-containing bacterium isolated from a low-mineralized soda lake of eastern Siberia. *Microbiology* **78**: 92–101.
- Brune, D.C. (1995) Sulfur compounds as photosynthetic electron donors. V knize *Anoxygenic photosynthetic bacteria*. Blankenship, R.E., Madigan, M.T., Bauer, C.E. (ed.). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, str. 847–870.
- Cheng, Y.S., Brantner, C.A., Tsapin, A., Collins, M.L.P. (2000) Role of the H protein in assembly of the photochemical reaction center and intracytoplasmic membrane in *Rhodospirillum rubrum*. *J Bacteriol* **182**: 1200–1207.
- Collins, M.D., Jones, D. (1981) Distribution of isoprenoid quinone structural types in bacteria and their taxonomic implications. *Microbiol Rev* **45**: 316–354.
- Cogdell, R.J., Isaacs, N.W., Howard, T.D., McLuskey, K., Fraser, N.J., Prince, S.M. (1999) How photosynthetic bacteria harvest solar energy. *J Bacteriol* **181**: 3869–3879.
- Cogdell, R.J., Lindsay, J.G. (2000) The structure of photosynthetic complexes in bacteria and plants: an illustration of the importance of protein structure to the future development of plant science. *New Phytol* **145**: 167–196.
- Csotonyi, J.T., Stackebrandt, E., Yurkov, V. (2006) Anaerobic respiration on tellurate and other metalloids in bacteria from hydrothermal vent fields in the eastern Pacific Ocean. *Appl Environ Microbiol* **72**: 4950–4956.
- Dijkman, N., Kaftan, D., Trtílek, M., Nedbal, L. (1999) Measurements of phytoplankton of sub-nanomolar chlorophyll concentrations by a modified double-modulation fluorometer. *Photosynthetica* **37**: 249–254.
- Dulebo, A.: osobní sdělení.
- Esser, L., Elberry, M., Zhou, F., Yu, C.-A., Yu, L., Xia, D. (2008) Inhibitor-complexed structures of the cytochrom *bc<sub>1</sub>* from the photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides*. *J Biol Chem* **283**: 2846–2857.
- Fraser, N.J., Hashimoto, H., Cogdell, R.J. (2001) Carotenoids and bacterial photosynthesis: The story so far... *Photosynth Res* **70**: 249–256.



- Fritzsche, G., Kuglstatter, A. (1999) The structure of reaction center from purple bacteria. V knize *The photochemistry of carotenoids*. Frank, H.A., Yong, A.S., Britton, G., Cogdell, R.J. (ed.). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, str. 99–122.
- Fuchs, B.M., Spring, S., Teeling, H., Quast, C., Wulf, J., Schattenhofer, M., Yan, S., Ferreira, S., Johnson, J., Glöckner, F.O., Amann, R. (2007) Characterization of a marine gammaproteobacterium capable of aerobic anoxygenic photosynthesis. *Proc Natl Acad Sci* **104**: 2891–2896.
- Fuerst, J.A., Hawkins, J.A., Holme, A., Sly, L.I., Moore, C.J., Stackebrandt, E. (1993) *Porphyrobacter neustonensis* gen. nov., sp. nov., an aerobic bacteriochlorophyll-synthesizing budding bacterium from fresh water. *Int J Syst Bacteriol* **43**: 125–134.
- Gich, R., Overmann, J. (2006) *Sandarakinorhabdus limnophila* gen. nov., sp. nov., a novel bacteriochlorophyll *a*-containing, obligately aerobic bacterium isolated from freshwater lakes. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**: 847–854.
- Gray, K.A., Daldal, F. (1995) Mutational studies of the cytochrome *bc<sub>1</sub>* complexes. V knize *Anoxygenic photosynthetic bacteria*. Blankenship, R.E., Madigan, M.T., Bauer, C.E. (ed.). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, str. 747–774.
- Hanada, S., Kawase, Y., Hiraishi, A., Takaichi, S., Matsuura, K., Shimada, K., Nagashima, K.V.P. (1997) *Porphyrobacter tepidarius* sp. nov., a moderately thermophilic aerobic photosynthetic bacterium isolated from a hot spring. *Int J Syst Bacteriol* **47**: 408–413.
- Harashima, K., Shiba, T., Totsuka, T., Simidu, U., Taga, N. (1978) Occurrence of bacteriochlorophyll *a* in a strain of an aerobic heterotrophic bacterium. *Agric Biol Chem* **42**: 1627–1628. Cit. dle Shiba, T., Simidu, U., Taga, N. (1979) Distribution of aerobic bacteria which contain bacteriochlorophyll *a*. *Appl Environ Microbiol* **38**: 43–45.
- Harashima, K., Hayasaki, J., Ikori, T. Shiba, T. (1980) O<sub>2</sub>-stimulated synthesis of bacteriochlorophyll and carotenoids in marine bacteria. *Plant Cell Physiol* **21**: 1283–1294.
- Hiraishi, A., Matsuzawa, Y., Kanbe, T., Wakao, N. (2000) *Acidisphaera rubrifaciens* gen. nov., sp. nov., an aerobic bacteriochlorophyll-containing bacterium isolated from acidic environments. *Int J Syst Evol Microbiol* **50**: 1539–1546.
- Hiraishi, A., Shimada, K. (2001) Aerobic anoxygenic photosynthetic bacteria with zinc-bacteriochlorophyll. *J Gen Appl Microbiol* **47**: 161–180.

- Hucke, O., Schiltz, E., Drews, G., Labahn, A. (2003) Sequence analysis reveals new membrane anchor of reaction centre-bound cytochromes possibly related to PufX. *FEBS Lett* **535**: 166–170.
- Jungas, C., Ranck, J.-L., Rigaud, J.-L., Joliot, P., Verméglio, A. (1999) Supramolecular organization of the photosynthetic apparatus of *Rhodobacter sphaeroides*. *EMBO J* **18**: 534–542.
- Karrasch, S., Bullough, P.A., Ghosh, R. (1995) The 8.5 Å projection map of the light-harvesting complex I from *Rhodospirillum rubrum* reveals a ring composed of 16 subunits. *EMBO J* **14**: 631–638.
- Kiley, P.J., Kaplan, S. (1988) Molecular genetics of photosynthetic membrane biosynthesis in *Rhodobacter sphaeroides*. *Microbiol Rev* **52**: 50–69.
- Kim, B.-C., Park, J.R., Bae, J.-W., Rhee, S.-K., Kim, K.-H., Oh, J.-W., Park, Y.-H. (2006) *Stappia marina* sp. nov., a marine bacterium isolated from the Yellow Sea. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**: 75–79.
- Kim, M.K., Schubert, K., Im, W.-K., Kim, K.-H., Lee, S.-T., Overmann, J. (2007) *Sphingomonas kaistensis* sp. nov., a novel alphaproteobacterium containing *pufLM* genes. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**: 1527–1534.
- Koblížek, M.: nepublikovaná data.
- Koblížek, M., Prášil, O. (2002) Fototrofní bakterie: Nově objevené metabolické strategie v oceánech. *Vesmír* **81**: 505–507.
- Koblížek, M., Bějá, O., Bidigare, R.R., Christensen, S., Benitez-Nelson, B., Vetriani, C., Kolber, M.K., Falkowski, P.G., Kolber, Z.S. (2003) Isolation and characterization of *Erythrobacter* sp. strains from the upper ocean. *Arch Microbiol* **180**: 327–338.
- Koblížek, M., Stoń-Egiert, J., Sagan, S., Kolber, Z.S. (2005a) Diel changes in bacteriochlorophyll *a* concentration suggest rapid bacterioplankton cycling in the Baltic Sea. *FEMS Microbiol Ecol* **51**: 353–361.
- Koblížek, M., Shih, J.D., Breitbart, S.I., Ratcliffe, E.C., Kolber, Z.S., Hunter, C.N., Biederman, R.A. (2005b) Sequential assembly of photosynthetic units in *Rhodobacter sphaeroides* as revealed by fast repetition rate analysis of variable bacteriochlorophyll *a* fluorescence. *Biochim Biophys Acta* **1706**: 220–231.
- Koblížek, M., Falkowski, P.G., Kolber, Z.S. (2006) Diversity and distribution of photosynthetic bacteria in the Black Sea. *Deep-Sea Res II* **53**: 1934–1944.

- Koblížek, M., Mlčoušková, J., Kolber, Z.S., Kopecký, J. (2010) On the photosynthetic properties of marine bacterium COL2P belonging to *Roseobacter* clade. *Arch Microbiol* **192**: 41–49.
- Kolber, Z.S., Van Dover, C.L., Niederman, R.A., Falkowski, P.G. (2000) Bacterial photosynthesis in surface waters of the open ocean. *Nature* **407**: 177–179.
- Kolber, Z.S., Plumley, F.G., Lang, A.S., Beatty, J.T., Blankenship, R.E., Van Dover, C.L., Vetriani, C., Koblížek, M., Rathgeber, C., Falkowski, P.G. (2001) Contribution of aerobic photoheterotrophic bacteria to the carbon cycle in the ocean. *Science* **292**: 2492–2495.
- Krinsky, N.I. (1979) Carotenoid protection against oxidation. *Pure Appl Chem* **51**: 649–660.
- Labrenz, M., Collins, M.D., Lawson, P.A., Tindall, B.J., Schumann, P., Hirsch, P. (1999) *Roseovarius tolerans* gen. nov., sp. nov., a budding bacterium with variable bacteriochlorophyll *a* production from hypersaline Ekho Lake. *Int J Syst Bacteriol* **49**: 137–147.
- Labrenz, M., Tindall, B.J., Lawson, P.A., Collins, M.D., Schumann, P., Hirsch, P. (2000) *Staleyia guttiformis* gen. nov., sp. nov., and *Sulfitobacter brevis* sp. nov.,  $\alpha$ -3-*Proteobacteria* from hypersaline, heliothermal and meromictic antarctic Ekho Lake. *Int J Syst Bacteriol* **50**: 303–313.
- Labrenz, M., Lawson, P.A., Tindall, B.J., Collins, M.D., Hirsch, P. (2005) *Roseisalinus antarcticus* gen. nov., sp. nov., a novel aerobic bacteriochlorophyll *a*-producing  $\alpha$ -proteobacterium isolated from hypersaline Ekho Lake, Antarctica. *Int J Syst Bacteriol* **55**: 41–47.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680–685.
- Lami, R., Cottrell, M.T., Ras, J., Ulloa, O., Obernosterer, I., Claustre, H., Kirchman, D.L., Lebaron, P. (2007) High abundances of aerobic anoxygenic photosynthetic bacteria in the South Pacific Ocean. *Appl Environ Microbiol* **73**: 4198–4205.
- Lancaster, C.R.D., Michel, H. (1999) Refined crystal structures of reaction centres from *Rhodospseudomonas viridis* in complexes with the herbicide atrazine and two chiral atrazine derivatives also lead to a new model of the bound carotenoid. *J Mol Biol* **286**: 883–898.

- Lancaster, C.R.D, Michel, H. (2001) Photosynthetic reaction centers of purple bacteria. V knize *Handbook of metalloproteins*. Messerschmidt, A., Huber, R., Poulos, T., Wieghardt, K. (ed.). Chichester: John Wiley & Sons, str. 118–135.
- Laverman, A.M., Blum J.S., Schaeffer, J.K., Phillips, E.J.P, Lovley, D.R., Oremland, R.S. (1995) Growth of strain SES-3 with arsenate and other diverse electron acceptors. *Appl Environ Microbiol* **61**: 3556–3561.
- Law, C.J., Roszak, A.W., Southall, J., Gardiner, A.T., Isaacs, N.W., Cogdell, R.J. (2004) The structure and function of bacterial light-harvesting complexes. *Mol Membr Biol* **21**: 183–191.
- Lovley, D.R., Phillips E.J.P., Gorby, Y.A., Landa, E.R. (1991) Microbial reduction of uranium. *Nature* **350**: 413–416.
- Macián, M.C., Arahál, D.R., Garay, E., Ludwig, W., Schleiter, K.H., Pujalte, M.J. (2005) *Thalassobacter stenotrophicus* gen. nov., sp. nov., a novel marine  $\alpha$ -proteobacterium isolated from Mediterranean sea water. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**: 105–110.
- Marchand, E.A., Silverstein, J. (2003) The role of enhanced heterotrophic bacterial growth on iron oxidation by *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Geomicrobiol J* **20**: 231–244.
- Mas, J., van Gemerden, H. (1995) Storage products in purple and green sulfur bacteria. V knize *Anoxygenic photosynthetic bacteria*. Blankenship, R.E., Madigan, M.T., Bauer, C.E. (ed.). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, str. 973–990.
- Mašín, M., Nedoma, J., Pechar, L., Koblížek, M. (2008) Distribution of aerobic anoxygenic phototrophs in temperature freshwater systems. *Environ Microbiol* **10**: 1988–1996.
- Meckenstock, R.U., Brunisholz, R.A., Zuber, H. (1992a) The light-harvesting core-complex and the B820-subunit from *Rhodopseudomonas marina*. Part I. Purification and characterization. *FEBS Lett* **311**: 128–134.
- Meckenstock, R.U., Krusche, K., Brunisholz, R.A., Zuber, H. (1992b) The light-harvesting core-complex and the B820-subunit from *Rhodopseudomonas marina*. Part II. Electron microscopic characterization. *FEBS Lett* **311**: 135–138.
- Moore, M.D., Kaplan, S. (1992) Identification of intrinsic high-level resistance to rare-earth oxides and oxyanions in members of the class *Proteobacteria*: characterization of tellurite, selenite, and rhodium sesquioxide reduction in *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol* **174**: 1505–1514.

- Okamura, K., Mitsumori, F., Ito, O., Takamiya, K.-I., Nishimura, M. (1986) Photophosphorylation and oxidative phosphorylation in intact cells and chromatophores of an aerobic photosynthetic bacterium, *Erythrobacter* sp. strain Och114. *J Bacteriol* **168**: 1142–1146.
- Ouchane, S., Steunou, A.-S., Picaud, M., Astzier, C. (2004) Aerobic and anaerobic Mg-protoporphyrin monomethyl ester cyclases in purple bacteria. *J Biol Chem* **279**: 6385–6394.
- Oz, A., Sabehi, G., Koblížek, M., Massana, R., Bèjà, O. (2005) *Roseobacter*-like bacteria in Red and Mediterranean Sea aerobic anoxygenic photosynthetic populations. *Appl Environ Microbiol* **71**: 344–353.
- Qian, P., Yagura, T., Koyama, Y., Cogdell, R.J. (2000) Isolation and purification of the reaction center (RC) and the core (RC-LH1) complex from *Rhodobium marinum*: the LH1 ring of the detergent-solubilized core complex contains 32 bacteriochlorophylls. *Plant Cell Physiol* **41**: 1347–1353.
- Rainey, F.A., Silva, J., Nobre, M.F., Silva, M.T., da Costa, M.S. (2003) *Porphyrobacter cryptus* sp. nov., a novel slightly thermophilic, aerobic, bacteriochlorophyll *a*-containing species. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**: 35–41.
- Rathgeber, C., Yurkova, N., Stackebrandt, E., Beatty, J.T., Yurkov, V. (2002) Isolation of tellurite- and selenite-resistant bacteria from hydrothermal vents of the Juan de Fuca Ridge in the Pacific Ocean. *Appl Environ Microbiol* **68**: 4613–4622.
- Rathgeber, C., Beatty, J.T., Yurkov, V. (2004) Aerobic phototrophic bacteria: new evidence for the diversity, ecological importance and applied potential of this previously overlooked group. *Photosynth Res* **81**: 113–128.
- Rathgeber, C., Yurkova, N., Stackebrandt, E., Schumann, P., Beatty, J.T., Yurkov, V. (2005) *Roseicyclus mahoneyensis* gen. nov., sp. nov., an aerobic phototrophic bacterium isolated from a meromictic lake. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**: 1597–1603.
- Rohwerder, T., Sand, W. (2003) The sulfane sulfur of persulfides is the actual substrate of the sulfur-oxidizing enzymes from *Acidithiobacillus* and *Acidiphilium* spp. *Microbiology* **149**: 1699–1709.
- Saitoh, S., Suzuki, T., Nishimura, Y. (1998) Proposal of *Craurococcus roseus* gen. nov., sp. nov. and *Paracraurococcus ruber* gen. nov., sp. nov., novel aerobic

- bacteriochlorophyll *a*-containing bacteria from soil. *Int J Syst Bacteriol* **48**: 1043–1047.
- Scheuring, S., Francia, F., Busselez, J., Melandri, B.A., Rigaud, J.-L., Lévy, D. (2004) Structural role of PufX in the dimerization of the photosynthetic core complex of *Rhodobacter sphaeroides*. *J Biol Chem* **279**: 3620–3626.
- Scheuring, S., Busselez, J., Lévy, D. (2005) Structure of the dimeric PufX-containing core complex of *Rhodobacter blasticus* by *in situ* atomic force microscopy. *J Biol Chem* **280**: 1426–1431.
- Schwalbach, M.S., Fuhrman, J.A. (2005) Wide-ranging abundances of aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in the world ocean revealed by epifluorescence microscopy and quantitative PCR. *Limnol Oceanogr* **50**: 385–393.
- Schwarze, C., Carluccio, A.V., Venturoli, G., Labahn, A. (2000) Photo-induced cyclic electron transfer involving cytochrome *bc<sub>1</sub>* complex and reaction center in the obligate aerobic phototroph *Roseobacter denitrificans*. *Eur J Biochem* **267**: 422–433.
- Scolnik, P.A., Walker, M.A., Marrs, B.L. (1980) Biosynthesis of carotenoids derived from neurosporene in *Rhodopseudomonas capsulata*. *J Biol Chem* **255**: 2427–2432.
- Shiba, T., Simidu, U., Taga, N. (1979) Distribution of aerobic bacteria which contain bacteriochlorophyll *a*. *Appl Environ Microbiol* **38**: 43–45.
- Shiba, T., Simidu, U. (1982) *Erythrobacter longus* gen. nov., sp. nov., an aerobic bacterium which contains bacteriochlorophyll *a*. *Int J Syst Bacteriol* **32**: 211–217.
- Shiba, T., Shioi, Y., Takamiya, K.-I., Sutton, D.C., Wilkinson, C.R. (1991) Distribution and physiology of aerobic bacteria containing bacteriochlorophyll *a* on the east and west coasts of Australia. *Appl Environ Microbiol* **57**: 295–300.
- Shimada, K. (1995) Aerobic anoxygenic phototrophs. V knize *Anoxygenic photosynthetic bacteria*. Blankenship, R.E., Madigan, M.T., Bauer, C.E. (ed.). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, str. 105–122.
- Sieracki, M.E., Gilg, I.C., Thier, E.C., Poulton, N.J., Goericke, R. (2006) Distribution of planktonic aerobic anoxygenic photoheterotrophic bacteria in the northwest Atlantic. *Limnol Oceanogr* **51**: 38–46.
- Sorokin, D.Y., Tourova, T.P., Kuznetsov, B.B., Bryantseva, I.A., Gorlenko, V.M. (2000) *Roseinatronobacter thiooxidans* gen. nov., sp. nov., a new alkaliphilic aerobic

- bacteriochlorophyll *a*-containing bacterium isolated from soda lake. *Microbiology* **69**: 89–97.
- Sundström, V., Pullerits, T., van Grondelle, R. (1999) Photosynthetic light-harvesting: Reconciling dynamics and structure of purple bacterial LH2 reveals function of photosynthetic unit. *J Phys Chem B* **103**: 2327–2346.
- Suyama, T., Shigematsu, T., Takaichi, S., Nodasaka, Y., Fujikawa, S., Hosoya, H., Tokiwa, Y., Kanagawa, T., Hanada, S. (1999) *Rosealetes depolymerans* gen. nov., sp. nov., a new bacteriochlorophyll *a*-containing obligate aerobe belonging to the  $\beta$ -subclass of the *Proteobacteria*. *Int J Syst Bacteriol* **49**: 449–457.
- Suzuki, T., Muroga, Y., Takahama, M., Nishimura, Y. (1999a) *Roseivivax halodurans* gen. nov., sp. nov. and *Roseivivax halotolerans* sp. nov., aerobic bacteriochlorophyll-containing bacteria isolated from a saline lake. *Int J Syst Bacteriol* **49**: 629–634.
- Suzuki, T., Muroga, Y., Takahama, M., Shiba, T., Nishimura, Y. (1999b) *Rubrimonas cliftonensis* gen. nov., sp. nov., an aerobic bacteriochlorophyll-containing bacterium isolated from a saline lake. *Int J Syst Bacteriol* **49**: 201–205.
- Suzuki, T., Mori, Y., Nishimura, Y. (2006) *Roseibacterium elongatum* gen. nov., sp. nov., an aerobic, bacteriochlorophyll-containing bacterium isolated from the west coast of Australia. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**: 417–421.
- Swingley, W.D., Sadekar, S., Mastrian, S.D., Matthies, H.J., Hao, J., Ramos, H., Acharya, C.R., Conrad, A.L., Taylor, H.L., Dejesa, L.C., Shah, M.K., O'Huallachain, M.E., Lince, M.T., Blankenship, R.E., Beatty, J.T., Touchman, J.W. (2007) The complete genome sequence of *Roseobacter denitrificans* reveals a mixotrophic rather than photosynthetic metabolism. *J Bacteriol* **189**: 683–690.
- Takaichi, S. (1999) Carotenoids and carotenogenesis in anoxygenic photosynthetic bacteria. V knize *The photochemistry of carotenoids*. Frank, H.A., Young, A.S., Britton, G., Cogdell, R.J. (ed.). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, str. 39–69.
- Trtílek, M., Kamer, D.M., Koblížek, M., Nedbal, L. (1997) Dual-modulation LED kinetic fluorometer. *J Luminesc* **72-74**: 597–599.
- Voet, D., Voet, J.G. (1995) Příprava čistých proteinů. V knize *Biochemie*. Voet, D., Voet, J.G. (ed.). Praha: Victoria Publishing, str. 79–111.
- Waidner, L.A., Kirchman, D.L. (2007) Aerobic anoxygenic phototrophic bacteria attached to particles in turbid waters of the Delaware and Chesapeake Estuaries. *Appl Environ Microbiol* **73**: 3936–3944.

- Wakao, N., Yokoi, N., Isoyama, N., Hiraishi, A., Shimada, K., Kobayashi, M., Kise, H., Iwaki, M., Itoh, S., Takaichi, S., Samuraj, Y. (1996) Discovery of natural photosynthesis using Zn-containing bacteriochlorophyll in an aerobic bacterium *Aciciphilium rubrum*. *Plant Cell Physiol* **37**: 889–893.
- Xiong, J., Bauer, C.E. (2002) Complex evolution of photosynthesis. *Annu Rev Plant Biol* **53**: 503–521.
- Yurkov, V., Stackebrandt, E., Holmes, A., Fuerst, J.A., Hugenholtz, P., Golecki, J., Gad'on, N., Gorlenko, V.M., Kompantseva, E.J., Drews, G. (1994) Phylogenetic positions of novel aerobic, bacteriochlorophyll *a*-containing bacteria and description of *Roseococcus thiosulfatophilus* gen. nov., sp. nov., *Erythromicrobium ramosum* gen. nov., sp. nov., and *Erythrobacter litoralis* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* **44**: 427–434.
- Yurkov, V., Jappé, J., Verméglio, A. (1996) Tellurite resistance and reduction by obligately aerobic photosynthetic bacteria. *Appl Environ Microbiol* **62**: 4195–4198.
- Yurkov, V., Stactkebrandt, E., Buss, O., Vermeglio, A., Gorlenko, V., Beatty, J.T. (1997) Reorganization of the genus *Erythromicrobium*: Description of „*Erythromicrobium sibiricum*“ as *Sandaracinobacter sibiricus* gen. nov., sp. nov., and of „*Erythromicrobium ursincola*“ as *Erythromonas ursincola* gen. nov., sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* **47**: 1172–1178.
- Yurkov, V., Beatty, J.T. (1998a) Aerobic anoxygenic phototrophic bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 695–724.
- Yurkov, V., Beatty, J.T. (1998b) Isolation of aerobic anoxygenic photosynthetic bacteria from black smoker plume waters of the Juan de Fuca Ridge in the Pacific Ocean. *Appl Environ Microbiol* **64**: 337–341.
- Yurkov, V., Menin, L., Schoepp, B., Verméglio, A. (1998c) Purification and characterization of reaction center from the obligate aerobic phototrophic bacteria *Erythrobacter litoralis*, *Erythromonas ursincola* and *Sandaracinobacter sibiricus*. *Photosynth Res* **57**: 129–138.
- Yurkov, V., Krieger, S., Stackebrandt, E., Beatty, J.T. (1999) *Citromicrobium bathyomarinum*, a novel aerobic bacterium isolated from deep-sea hydrothermal vent plume waters that contains photosynthetic pigment-protein complexes. *J Bacteriol* **181**: 4517–4525.



- Yurkov, V. (2006) Aerobic phototrophic proteobacteria. V knize *The prokaryotes*. Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackenbrandt, E. (ed.). New York: Springer, str. 562–584.
- Yurkov, V., Csotonyi, J.T. (2009) New light on aerobic anoxygenic phototrophs. V knize *The purple phototrophic bacteria*. Hunter, C.N., Daldal, F., Thurnauer, M.C., Beatty, J.T. (ed.). Dordrecht: Springer Science + Business Media B.V., str. 31–55.
- Yurkova, N., Rathgeber, C., Swiderski, J., Stackenbrandt, E., Beatty, J.T., Hall, K.J., Yurkov, V. (2002) Diversity, distribution and physiology of the aerobic phototrophic bacteria in the mixolimnion of a meromictic lake. *FEMS Microbiol Ecol* **40**: 191–204.
- Yutin, N., Béjà, O. (2005) Putative novel photosynthetic reaction centre organizations in marine aerobic anoxygenic photosynthetic bacteria: insights from metagenomics and environmental genomics. *Environ Microbiol* **7**: 2027–2033.
- Zhang, L.Y., Friesner, R.A. (1995) *Ab initio* electronic structure calculation of the redox potentials of bacteriochlorophyll and bacteriopheophytin in solution. *J Phys Chem* **99**: 16479–16482.
- Zubkov, M.V. (2009) Photoheterotrophy in marine prokaryotes. *J Plank Res* **31**: 933–938.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NZ\\_AAMW01000003.1](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NZ_AAMW01000003.1), staženo 30. 7. 2009.

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovateli.

Jméno a příjmení, adresa	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka